

Aus der Klinik für Neonatologie, Campus Virchow
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Sauerstofftoxizität im unreifen Gehirn – Einfluss auf die Expression von apoptotischen Genen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen“

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Lieselotte Mahler

aus Kassel

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Christoph Bührer

2. Prof. Dr. med. Jörg Weber

3. Prof. Dr. med. Georg Simbruner

eingereicht: 11.02.2005

Datum der Promotion: 01.07.2005

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie enthält auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur habe ich vollständig angegeben.

Berlin, den 10.02.05

Lieselotte Mahler

DANKSAGUNG

Ein herzlicher Dank gilt folgenden Personen und Institutionen, ohne deren Hilfe die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

PD Dr. Ursula Felderhoff-Mueser für die Überlassung des Themas, die vielfältige Unterstützung und die hervorragende Betreuung der Arbeit.

Meinem Doktorvater PD Dr. Christoph Bühner für die hilfreiche, gute und stets nette Betreuung. Herrn Marco Sifringer für die unermüdliche, tatkräftige, qualifizierte und immer geduldige Hilfe bei der täglichen Laborarbeit, wie auch bei der fachlichen Beratung der Arbeit.

PD Dr. Chryssanthi Ikonomidou für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und ihre Beratung. Herrn Henrik Hansen für seine vielseitige Unterstützung im Labor.

Allen hier namentlich nicht erwähnten Mitarbeitern der AG Ikonomidou für ihre Hilfsbereitschaft und viele gute Ratschläge.

Meinen Eltern Annegret und Eugen Mahler, meiner Freundin Karen Blome und meinen guten Freund Peter Polzer für ihre liebevolle Unterstützung.

1. EINLEITUNG	6
1.1. HYPEROXIE	6
1.1.1. Physiologische Veränderungen während der Geburt.....	6
1.1.2. Hyperoxie und ihre Auswirkungen.....	6
1.1.3. Direkte Toxizität von Sauerstoff.....	7
1.1.4. Maladaptive physiologische Antwort auf Sauerstoff.....	8
1.1.5. Auswirkungen von Hyperoxie auf das sich entwickelnde Gehirn	8
1.2. ZYTOKINE	10
1.2.1. Zytokine und Neurodegeneration im neonatalen Gehirn.....	10
1.2.2. Hyperoxie und Zytokinproduktion	11
1.2.3. Wirkungsmechanismen von Zytokinen	12
1.2.3.1. IL-1_ und IL-18	12
1.2.3.2. IL-10.....	14
1.3. WACHSTUMSFAKTOREN.....	15
1.3.1. Die Bedeutung der Neurotrophine im sich entwickelnden Gehirn.....	15
1.3.2. Wirkungswege der Neurotrophine.....	16
1.3.3. Neurotrophine und Hyperoxie.....	18
1.4. DIE PERIODE DES RAPIDEN HIRNWACHSTUMS („Brain growth spurt period“)	19
1.5. APOPTOSE	20
1.5.1. Morphologische Kennzeichen der Apoptose.....	21
1.5.2. Die genetische Regulation der Apoptose.....	21
1.6. FORMULIERUNG DER ZENTRALEN FRAGESTELLUNG	23
2. MATERIAL.....	24
2.1. GERÄTE UND HILFSMITTEL	24
2.2. CHEMIKALIEN.....	25
2.3. HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN	28
2.4. KITS	30
2.5. ENZYME.....	30
2.6. ANTIKÖRPER	31
2.7. OLIGONUKLEOTIDE	31
2.7.1. Oligonukleotide für die reverse Transkription.....	31
2.7.2. Oligonukleotide für die semiquantitative PCR.....	31
2.8. MOLEKULARGEWICHTSMARKER	33
2.9. TIERE.....	34
2.10. SOFTWARE UND DATENBANKEN.....	34
3. METHODEN.....	35

3.1. FLUSSDIAGRAMM DER VERWENDETEN METHODE RT-PCR	35
3.2. FLUSSDIAGRAMM DER VERWENDETEN METHODE WESTERN BLOT	36
3.3. TIERVERSUCHE: TIERE, VERSUCHSAUFBAU, TIERSCHUTZ.....	37
3.4. PRÄPARATION VON HIRNGEWEBE	38
3.4.1. Präparation für molekularbiologische Untersuchungen.....	38
3.4.2. Perfusion und Präparation für histologische und immunhistochemische Untersuchungen	38
3.5. RT-PCR	39
3.5.1. Isolierung und Reinigung von RNA aus Hirngewebe	39
3.5.2. RNA-Konzentrationsbestimmung	39
3.5.3. DNase-Behandlung der präparierten RNA-Lösung mit anschließender Phenol- Chloroform-Isoamylalkohol-Behandlung	40
3.5.4. RNA-Kontrollelektrophorese	40
3.5.5. Semiquantitative RT-PCR: Theoretische Aspekte	41
3.5.5.1. Reverse Transkription von mRNA in cDNA.....	42
3.5.5.2. Kontroll-PCR und Elektrophorese der cDNA	42
3.5.5.3. Amplifizierung der cDNA mittels Polymerasekettenreaktion	43
3.5.5.4. Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente	45
3.5.5.5. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen.....	46
3.5.5.6. Densitometrische Auswertung der Polyacrylamidgele.....	47
3.6. WESTERN BLOT	48
3.6.1. Proteinextraktion.....	48
3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	48
3.6.3. Gelelektrophorese	49
3.6.4. Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Tankblot-Verfahren)	50
3.6.5. Blockierung	50
3.6.6. Röntgenfilmentwicklung.....	51
3.6.7. Entfernen gebundener Antikörper („Stripping“)	51
3.7. HISTOLOGISCHE VERFAHREN	52
3.7.1. DeOlmos Kupfersilberfärbung	52
3.7.2. Morphometrie	53
3.7.3. Statistische Auswertung	54
3.7.4. TUNEL-Färbung.....	54
3.7.5. Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3.....	54
4. ERGEBNISSE	56
4.1. PHYSIOLOGISCHE PARAMETER	56
4.2. HISTOLOGISCHER NACHWEIS DER APOPTOSE	56
4.3. DER EINFLUSS VON HYPEROXIE AUF DIE EXPRESSION DER WACHSTUMSFAKTOREN	58
4.4. REGULATION DER FAS- UND ZYTOKINEXPRESSIION UND DER CASPASE-3-AKTIVITÄT UNTER HYPEROXIE.....	62
4.4.1. Hochregulierung des Todesrezeptors Fas durch Hyperoxie.....	62
4.4.2. Sauerstoffexposition triggert die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen.....	63

4.4.3. Sauerstoffexposition triggert die Transkription des IL-18-Rezeptors (IL-18R).....	65
4.4.4. Transkription des antiinflammatorischen IL-10 nach Hyperoxie	65
4.4.5. Gesteigerte Aktivität von Caspase-3 nach Hyperoxie.....	66
5. DISKUSSION	68
5.1. ALLGEMEINE BETRACHTUNG	68
5.2. HYPEROXIE FÜHRT ZU APOPTOSE.....	69
5.2.1. Apoptotische Neurodegeneration als Folge von Hyperoxie im sich entwickelnden Rattengehirn	69
5.2.2. Einfluss von O ₂ auf Fas und Caspase-3	69
5.2.3. Gesteigerte Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns für Hyperoxie	70
5.3. HYPEROXIE FÜHRT ZUR HERABREGULIERUNG DER WACHSTUMSFAKTOREN	71
5.4. HYPEROXIE FÜHRT ZUR GESTEIGERTEN EXPRESSION VON CASPASE-1-ABHÄNGIGEN INFLAMMATORISCHEN ZYTOKINEN	73
5.5. HOCHREGULIERUNG VON IL-10 ALS MÖGLICHER ENDOGENER KOMPENSATIONSMECHANISMUS.....	76
6. ZUSAMMENFASSUNG	78
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	80
8. LITERATURVERZEICHNIS	84

1. EINLEITUNG

1.1. HYPEROXIE

1.1.1. Physiologische Veränderungen während der Geburt

Beim Übergang vom intrauterinen zum postnatalen Leben kommt es zu drastischen physiologischen Veränderungen. Neugeborene sind nach der Geburt, verglichen mit den intrauterinen Verhältnissen (intrauteriner Sauerstoffpartialdruck: 25mmHg), einem unphysiologischen hohen Sauerstoffdruck ausgesetzt. Die Anpassung an die Umgebungsluft zieht Umstellungen des kardiovaskulären Systems nach sich, wobei der dramatische Anstieg des Sauerstoffdruckes im Blut eine der größten Veränderungen vom intrauterinen zum postnatalen Leben eines Neugeborenen darstellt¹.

1.1.2. Hyperoxie und ihre Auswirkungen

Hyperoxie spielt in der Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) und der Retinopathie von Frühgeborenen (*retinopathy of prematurity*, ROP), zweier der wichtigsten bleibenden Erkrankungen unreif geborener Kinder, eine Schlüsselrolle^{2, 3}. Hyperoxie, entstanden durch exzessive Sauerstoffgabe zur Therapie (z.B. bei der Wiederbelebung Neugeborener) oder bei unzulänglichem Antioxidationsschutz (durch ein unreifes Antioxidationssystem), kann zu Gewebeschäden durch zwei Mechanismen führen: Der erste Mechanismus ist gekennzeichnet durch die direkte Toxizität des Sauerstoffes, entstanden durch reaktive freie O₂-Radikale, der zweite durch eine maladaptive physiologische Antwort auf Sauerstoff⁴. Hyperoxie und freie O₂-Radikale spielen sowohl eine integrale Rolle im Alterungsprozess⁵ wie auch bei altersbedingten neurodegenerativen Veränderungen und Erkrankungen. Die mit dem Alterungsprozess verbundenen Beeinträchtigungen des Gedächtnisses und der motorischen Koordination gehen auf oxidative Schäden im zerebralen Kortex und im Cerebellum zurück⁶. Auch bei Erkrankungen wie M. Alzheimer und M. Huntington weist ein vermehrtes Auftreten von oxidiertem Kern- und Mitochondrial-DNA auf Folgen von Hyperoxie hin^{7, 8, 9}.

1.1.3. Direkte Toxizität von Sauerstoff

Normalerweise liegt Sauerstoff während des aeroben Energiemetabolismus in den Mitochondrien zu zwei Molekülen Wasser reduziert vor. Diese Elektrontransportreaktionen werden durch den Zytochrom-Oxidase-Enzymkomplex katalysiert. Dabei entstehen als Zwischenprodukte freie Radikale, die, wenn sie in hoher Anzahl vorliegen, zytotoxisch wirken können¹⁰. Das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) ist ein solches freies Radikal, das durch den Transfer von einem Elektron auf molekularen Sauerstoff entsteht. Es kann als Oxidant oder Reduktant wirken, sodass es sowohl zu Hydrogenperoxid (H_2O_2) als auch zu einem Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) reagieren kann¹¹. Jedes von diesen freien Radikalen kann zu zellulären Verletzungen auf verschiedenen Wegen führen. Hierbei ist vor allem die Peroxidation der Membranlipide zu nennen. Die dabei entstehenden Hydroperoxide sind potente Inhibitoren der Zellenzyme und können Proteine oder Membranen schädigen. Außerdem können freie O_2 -Radikale direkt DNA schädigen.

Sauerstofftoxizität ist besonders in der Lunge zu beobachten, wo direkter Kontakt mit dem eingeatmeten Sauerstoff besteht. Die bei erwachsenen Intensivpatienten auftretende Tracheobronchitis und das ARDS (*adult respiratory distress syndrome*) sind zum großen Teil auf direkte Effekte des eingeatmeten Sauerstoffs zurückzuführen. Bei Frühgeborenen besteht eine besonders große Anfälligkeit gegen die Sauerstofftoxizität aufgrund ihres unreifen Antioxidationssschutzes. Studien haben gezeigt, dass unreife Neugeborene deutlich schlechter in der Lage sind, die Aktivität von Antioxidationsenzymen wie Superoxiddismutase, Katalase, Gluthationperoxidase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase bei erhöhter Sauerstoffexposition hochzuregulieren als reife Neugeborene^{12, 13}. Daher neigen Frühgeborene besonders dazu, eine BPD zu entwickeln, charakterisiert durch eine dysregulierte Inflammation und veränderte Expression von Wachstumsfaktoren und Proteasen. In der initialen Phase der Sauerstofftoxizität kommt es zu Schädigungen des Alveolarepithels und des Kapillarendothels. Dies führt zu interstitiellen und alveolaren Ödemen, worauf eine Infiltration neutrophiler Zellen in das Gewebe folgt. Die zweite Phase der Sauerstofftoxizität ist charakterisiert durch eine Proliferation der Alveolarzellen Typ II und bei andauernder Sauerstoffexposition durch eine interstitielle Fibrose. Dies führt zu einem bleibenden Defekt des Gasaustausches in den Alveolen¹⁴.

1.1.4. Maladaptive physiologische Antwort auf Sauerstoff

Hierbei entstehen Schäden durch die Toxizität des Sauerstoffes auf indirektem Wege. Der Mechanismus beruht auf bekannten physiologischen Effekten, die abhängig vom gesundheitlichen Zustand eines Patienten maladaptiv sein können, und führt zur respiratorischen Depression, Hemmung der Erythropoese, Vasodilatation der Pulmonalgefäße und zu einer systemischen arteriellen Vasokonstriktion. Das bekannteste Beispiel ist die Retinopathie Frühgeborener (*retinopathy of prematurity*, ROP)⁴. Im ersten Stadium kommt es durch Hyperoxie zur Vasokonstriktion der retinalen Gefäße, welche bei andauernder Sauerstoffexposition zur Vasoobliteration führt. Im zweiten Stadium der ROP führt eine durch die Vasokonstriktion hervorgerufene lokale Gewebshypoxie zur Produktion von Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Es kommt zu einer Neovaskularisierung des Glaskörpers¹⁵. Diese Gefäße neigen zu Blutungen, die fibröse Vernarbungen nach sich ziehen, welche zur Traktion der Retina führen¹⁶.

1.1.5. Auswirkungen von Hyperoxie auf das sich entwickelnde Gehirn

Während es eine Vielzahl von klinischen und experimentellen Studien zur Aufklärung der Pathogenese vom BPD und ROP gibt, sind die Auswirkungen von Hyperoxie auf das unreife Gehirn weitgehend unbekannt.

Die ständigen Verbesserungen der neonatalen Intensivversorgung und die Fortschritte im Verständnis der fetalen Physiologie haben zu einem enormen Anstieg der Überlebensrate von Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht (< 1500g) geführt^{17, 18}. Daraus ergaben sich Fragen zur Qualität der neurologischen Entwicklung dieser Überlebenden. Tatsächlich finden sich häufig motorische und kognitive Beeinträchtigungen und Entwicklungsstörungen bei Kindern mit extrem niedrigem Geburtsgewicht (< 1000g). Mehr als 25% von Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht von 901–1000g und 43% von Kindern mit einem Geburtsgewicht von 401–500g (*extremely low birth weight infants*, ELBW: 400–1000g, SSW: 24–28) zeigten in prospektiven Studien eine schlechte neurologische Entwicklung. Das Risiko für eine neurologische Erkrankung und für Auffälligkeiten in der sensorischen und motorischen Entwicklung steigt also mit abfallendem Geburtsgewicht^{19, 20}.

Frühgeborene repräsentieren 5% aller Geburten, aber 50% aller Kinder mit frühkindlichen Hirnschädigungen²¹. Die neuropathologische Manifestation der Schädigung hängt entscheidend vom Entwicklungsstatus des Gehirns, aber auch von der Art der Schädigung und der stattgefundenen Interventionen ab²². Bei Reifgeborenen sind perinatale Asphyxien, bei

Frühgeborenen die Schädigungen der weißen Substanz, durch eine Vielzahl von Ursachen, wesentliche Faktoren eines neurologischen Folgeschadens²³.

Frühgeborene haben ein hohes Risiko, eine intrazerebrale Hämorrhagie, einen hämorrhagischen Parenchyminfarkt, eine periventrikuläre Leukomalazie (PVL) und wahrscheinlich am häufigsten eine diffuse Verletzung der Gehirnzellen ohne spätere Bildung sichtbarer Zysten zu entwickeln²⁴. Bei Reifgeborenen beobachtet man typischerweise die Schädigungen der Basalganglien, den Status marmoratus, während bei Frühgeborenen die PVL aber auch die diffuse multifokale Schädigung dominieren. Das klinische Bild ist sehr variabel und reicht von motorischen und kognitiven Entwicklungsverzögerungen bis zum Vollbild einer zerebralen Parese²⁵.

Eine ganze Reihe von schädigenden Auslösern sind mit Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn in Verbindung gebracht worden, so z.B. Hypoxie, Ischämie, Entzündungen, Drogen und andere neurotoxische Faktoren. Der zugrunde liegende Auslöser der diffusen Schädigung der Gehirnzellen bleibt jedoch weitgehend unklar. Intrazerebrale Blutungen und Hypoxie können die hohe Inzidenz der zerebralen Schädigung und der bleibenden neurologischen Defizite von Frühgeborenen nicht ausreichend erklären.

Epidemiologische Studien bei Neugeborenen mit extrem niedrigem Geburtsgewicht (400–1000g) haben den Zusammenhang zwischen Hypokapnie, Hyperoxie und anderen mit einer Beatmung verbundenen Risikofaktoren und einer zerebralen Parese untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Hyperoxie einen Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer zerebralen Parese darstellt²⁶.

Dass Hyperoxie in den Neuronen Apoptose induzieren kann, wurde auch in *in-vitro* Studien beobachtet. Dabei wurden PC12h-Zellen (eine Subklonart von PC12-Zellen) Hyperoxie ausgesetzt. Zusätzlich wurde zu einigen Zellen Ascorbinsäure als Schutz vor freien O₂-Radikalen oder N-Acetyl-L-Cystein (NAC) zur endogenen Stimulation der Glutathionperoxidase gegeben. In den toten Zellen konnten typische Veränderungen des apoptotischen Zelltodes wie DNA-Fragmente und Chromatinkugeln beobachtet werden. Dass Hyperoxie über freie O₂-Radikale zur Apoptose führt, konnte daraus geschlossen werden, dass der Zelltod durch die Gabe der Antioxidanzien verhindert werden konnte²⁷.

In *in-vivo* Studien wurden zwei Tage alte Ratten 95% Sauerstoff ausgesetzt. Einem Teil der Tiere wurde zusätzlich BSO (Buthioninsulfoximin) verabreicht, ein Glutathionsyntheseshemmer. Es wurde der Zusammenhang zwischen Hyperoxie, mangelndem Antioxidationschutz (durch verminderte Glutathionsynthese) und Apoptose im sich entwickelnden Gehirn untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass Hyperoxie eine Verminderung von NGF (*nerve growth factor*)

induzierte, während es durch BSO zu einem Abfall der Gluthationkonzentration kam. Bei den Tieren, die sowohl mit Hyperoxie als auch mit BSO behandelt wurden, konnte ein dramatischer Anstieg der Apoptose im Gehirn beobachtet werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass sowohl Hyperoxie als auch mangelnder Antioxidationschutz für vermehrte apoptotische Veränderungen im Gehirn verantwortlich sind. Möglicherweise ist dieser vermehrte Zelltod via Apoptose, ausgelöst durch Hyperoxie, verantwortlich für die Entstehung von bleibenden kognitiven Defiziten, die bei Frühgeborenen beobachtet wurden²⁸.

1.2. ZYTOKINE

1.2.1. Zytokine und Neurodegeneration im neonatalen Gehirn

Unter Zytokinen versteht man diverse Gruppen von Polypeptiden. Sie spielen unter anderem eine Rolle bei Entzündungen, immunologischen Vorgängen und bei Zelldifferenzierung bzw. Zelltod. Zu ihnen zählen Interleukine, Tumor-Nekrose-Faktoren und Chemokine. Zytokine haben viele verschiedene Wirkungen. Sie spielen eine große Rolle bei Reaktionen auf Organverletzungen, Infektionen und Entzündungen. Ihr Einfluss auf ZNS-Erkrankungen gewinnt zunehmend an Bedeutung in biologischen und klinischen Studien^{29, 30}.

Zytokine sind beteiligt als Mediatoren und Inhibitoren bei diversen Formen der Neurodegeneration und wirken über eine ganze Reihe von Mechanismen im ZNS³¹.

In den letzten Jahren werden inflammatorische Prozesse fernab vom kindlichen Gehirn als Auslöser für zerebrale Schädigungen diskutiert. Neonatal auftretende Schädigungen der weißen Substanz, welche bei mehr als 10% der Frühgeborenen gefunden wurden³², können später sowohl zu motorischen, kognitiven, visuellen Defiziten wie auch zu Teilleistungsstörungen führen^{33, 34}. Immer mehr Studien favorisieren die Hypothese, dass ein inflammatorisches Geschehen der Schädigung der neonatalen weißen Substanz vorangeht oder begleitend zu ihr auftritt^{35, 36, 37}. So wurden höhere Konzentrationen von Interleukinen im Nabelschnurblut von Kindern entdeckt, die später eine zerebrale Parese entwickelten³⁶. Auslöser wie eine mütterliche Chorioamnionitis^{38, 35, 39, 40} oder auch kindliche inflammatorische Erkrankungen wie z.B. eine nekrotisierende Enterokolitis, sind mit einer schlechten neurologischen Prognose assoziiert⁴¹. Vor allem die inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-18 und IL-6 spielen in der Pathogenese der PVL, des häufigsten neuropathologischen Befunds bei einer zerebralen Parese von Frühgeborenen, eine wichtige Rolle. Es zeigte sich, dass eine frühe inflammatorische

Reaktion, charakterisiert durch eine frühe Makrophagenreaktion mit massiver Zytokinproduktion, verbunden ist mit dem ersten Stadium einer PVL (Koagulationsnekrose)^{42,43}. In den letzten Jahren ist vor allem IL-18 in den Mittelpunkt der Studien im Zusammenhang mit Infektionen und Neurodegeneration im unreifen Gehirn gerückt. Es zeigte sich, dass IL-18-Konzentrationen im Nabelschnurblut von gesunden termingerechten Neugeborenen nicht nachzuweisen waren, während sich bei 58% von gesunden Frühgeborenen ein positives IL-18-Ergebnis fand, was die Überlegung nach sich zog, dass das Vorhandensein von IL-18 im Nabelschnurblut mit einer zu frühen Geburt verbunden ist. Darüber hinaus fanden sich deutlich höhere Konzentrationen von IL-18 bei Frühgeborenen, die später eine PVL entwickelten, als bei Frühgeborenen, bei denen später keine PVL auftrat. Die erhöhten IL-18-Konzentrationen könnten für pränatale inflammatorische Reaktionen sprechen³⁵. Die Erkenntnisse über den Beitrag von Zytokinen zur Neurodegeneration beruhen auf indirekten Beweisen, die hauptsächlich auf Veränderungen in der Expression und den Effekten rekombinanter Zytokine basieren, und vor allem auf direkten Studien, in welchen Ausschüttung und biologische Aktivität von endogenen Zytokinen näher bestimmt wurden³¹.

1.2.2. Hyperoxie und Zytokinproduktion

Eine Folge von Hyperoxie ist das Auslösen einer inflammatorischen Antwort mit erhöhter Zytokinproduktion in verschiedenen Organen. So ist die erhöhte Produktion von Zytokinen, verursacht durch Sauerstoffexposition, einer der Mechanismen, der im Frühstadium einer chronischen Lungenerkrankung bei Frühgeborenen eine Rolle spielt. Hyperoxie führt dabei zu einer Veränderung der Expression von inflammatorischen Zytokinen aus den Alveolarmakrophagen^{44, 45}. Nach Sauerstoffexposition kommt es in der unreifen Lunge zu einer stark erhöhten Produktion von *reactive oxygen intermediates* (ROI), da nur ein unzulängliches Antioxidationssystem vorhanden ist^{46, 47}. In vielen Zelltypen aktivieren ROI Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B⁴⁸. Die meisten der inflammatorischen Zytokine wie z.B. IL-1 α , TNF- α , IL-6 und IL-8, welche in den Lungen von Frühgeborenen gefunden wurden, die später eine chronische Lungenerkrankung entwickelten, haben eine NF- κ B-Zielsequenz in ihrer Promotorregion⁴⁹. Dies könnte erklären, wie Sauerstoffexposition zu einer Expression dieser inflammatorischen Zytokine *in vitro* führt⁵⁰. Darüber hinaus erklärt dieser Mechanismus, dass selbst eine Exposition mit kleinen Mengen von direktem Sauerstoff aufgrund des unreifen Antioxidationssystems ausreicht, um die initialen inflammatorischen Zeichen hervorzurufen, die dann zu einem CLD (*chronic lung disease*) führen⁵¹.

Im Rahmen ischämischer Reperfusion wurde eine Induktion der IL-18-Produktion beobachtet⁵². Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass Hyperoxie, über NO und aktive freie Sauerstoffradikale, eine entscheidende Rolle für eine erhöhte IL-18-Produktion spielt, welche dann möglicherweise über eine IFN- γ -Produktion zu Organschädigungen führt. Studien ergaben, dass eine Oxygenierung über die physiologischen Werte hinaus unter Umständen zu einem *fetal inflammatory response syndrome* (FIRS) und dadurch zu neurologischen Schädigungen bei unreifen Neugeborenen führen kann⁵³.

1.2.3. Wirkungsmechanismen von Zytokinen

Wirkungen und Mechanismen der einzelnen Zytokine unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht, und die übliche Unterteilung in proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine ist nicht immer eindeutig und kann je nach Auslöser und Lokalisation des Geschehens variieren. Im Folgenden werden die Mechanismen nur beispielhaft an einigen in dieser Arbeit untersuchten Zytokinen aufgezeigt.

1.2.3.1. IL-1 β und IL-18

IL-1 β und IL-18 gehören zu den proinflammatorischen Zytokinen. Sie gleichen sich sehr in Struktur, Wirkungsweise, Rezeptoraffinität und Signaltransduktion^{54, 55}.

IL-18, zunächst als IFN- γ -induzierender Faktor identifiziert, ist Mitglied der IL-1-Familie. Es ist ein pleiotropes Zytokin, welches von verschiedenen Zelltypen, wie Makrophagen, intestinalen Epithelzellen, Keratinozyten und Mikrogliazellen, exprimiert wird. IL-18 spielt bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle, indem es verschiedene Zytokine (IFN- γ , GM-CSF und TNF- α), Fas-Ligand und NO induziert und die Zytotoxizität von NK-Zellen erhöht^{56, 57, 58}. Darüber hinaus ist es in inflammatorische Reaktionen involviert. So spielt IL-18 z.B. eine Rolle bei der Schädigung des Lebergewebes im Rahmen einer Hepatitis⁵⁹.

Sowohl IL-18 als auch IL-1 β werden als inaktive Vorstufen synthetisiert und müssen von Caspase-1 (auch ICE, *IL-1 converting enzyme*) gespalten werden, um biologisch aktiv zu werden. Der Zusammenhang zwischen Caspase-1 und der Aktivierung von IL-1 β und IL-18 spielt eine große Rolle bei Schädigungen des neonatalen Gehirns nach Hypoxie und Ischämie^{60,61}. IL-1 β und IL-18 teilen viele Eigenschaften. Zusätzlich scheint IL-18 die proinflammatorischen Effekte von IL-1 β zu potenzieren und induziert in manchen Zellen vermutlich die IL-1 β -Produktion⁶².

Beide Zytokine setzen an einem Membran-assoziierten IL-Rezeptor an und führen über die Aktivierung von MyD88, IRAK (IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase), TRAF-6 (TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6) zur Aktivierung von NF- κ B. Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führt zu einer Expression von proinflammatorischen Genen, z.B. iNOS (*inducible nitric oxide synthase*)^{55, 63}. Durch iNOS kommt es zu einer verstärkten Schädigung des unreifen Gehirns⁶⁴, und auch die Aktivierung von NF- κ B scheint zur vermehrten Neurodegeneration nach Ischämie zu führen⁶⁵.

Des Weiteren kommt es nach der Bindung von IL-1 α und IL-18 an die Rezeptoren innerhalb der ersten 15 Minuten zu einer Reihe von Phosphorylierungen, in deren Verlauf eine Aktivierung der MAP-Kinase auftritt^{66, 67}.

Darüber hinaus induzieren IL-1 α und IL-18 die Expression von Chemokinen, wie z.B. IL-8, die chemotaktisch auf Monozyten, T-Zellen und eosinophile Granulozyten wirken. Studien haben gezeigt, dass es zu einer Aktivierung dieses Chemokinsystems im unreifen Gehirn nach Hypoxie/Ischämie kommt⁶⁸ und IL-1 β und IL-18 so zum Schädigungsvorgang beitragen⁶⁹. Eine weitere wichtige Funktion von IL-18 ist die Induktion der Zytokinproduktion (IL-2 und IFN- γ) der T-Helferzellen-1 (Th1-Zellen), was im Synergismus mit IL-12 geschieht. Durch IL-18 und IL-12 stimuliert werden nicht nur Th1-Zellen, sondern auch natürliche Killerzellen (NK) und aktivierte B-Zellen⁵⁶.

IL-18 trägt sowohl indirekt über diese inflammatorische Reaktion als auch direkt über eine Steigerung der Zytotoxizität der Immunzellen zum Schädigungsvorgang bei. IL-18 steigert die zytotoxische Aktivität der Immunzellen durch eine Hochregulation der Fas-Ligand-Expression auf NK und Th1-Zellen⁷⁰, und durch Perforin vermittelt es eine gesteigerte zytotoxische Aktivität von NK⁷¹.

Darüber hinaus konnte eine Expression von IL-18R auf Neuronen beobachtet werden, was nahe legt, dass IL-18 möglicherweise bisher unbekannte Einflüsse auf Neurone hat⁶³.

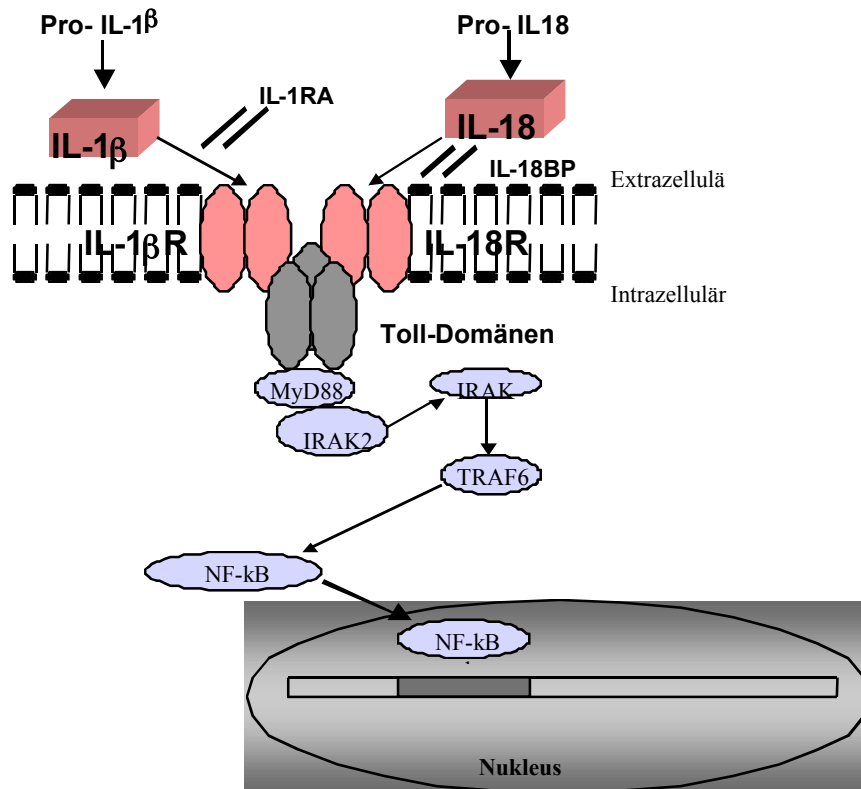


Abbildung 1: Signaltransduktion von IL-18 und IL-1β

1.2.3.2. IL-10

IL-10 wird im ZNS von Astrozyten und Mikrogliazellen synthetisiert und gehört zu den anti-inflammatorischen Zytokinen. Studien haben gezeigt, dass dieses Interleukin die Degeneration von Neuronen nach ZNS-Verletzungen reduzieren kann^{72, 73}. Das geschieht zum einen durch seine antiinflammatorische Wirkung, indem es die Synthese von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und IL-1 β , hemmt^{74, 75}. Darüber hinaus schützt IL-10 aber auch vor dem von Glutamat vermittelten Zelltod. Nach ZNS-Verletzungen kommt es zu einer abnormen Ausschüttung von Glutamat, was signifikant zur neurologischen Entwicklung beiträgt. Durch die Ausschüttung von Glutamat kommt es zur Aktivierung des Glutamatrezeptors, eines NMDA-Subtyps, was letztlich zu einem unnatürlichen Einstrom von Ca^{2+} in die Neuronen und damit zum Zelltod führt⁷⁶. IL-10 inhibiert nun diesen glutamatvermittelten apoptotischen Zelltod, indem es die Aktivität von proapoptotischen Faktoren blockiert. Proteasen, wie Caspase-3 und Transkriptionsfaktoren, wie der Kernfaktor NF- κB , spielen bei der Zelltoxizität von Glutamat

eine entscheidende Rolle. IL-10 vermindert nicht nur den glutamatvermittelten Anstieg der Aktivität von Caspase-3, sondern induziert sogar einen rapiden Abfall der Caspase-3 Aktivität. Darüber hinaus blockiert IL-10 die durch Glutamat induzierte DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B⁷⁷.

Die neuroprotektive Wirkung von IL-10 beruht also im Wesentlichen auf zwei Ansatzpunkten: dem antiinflammatorischen Effekt und der Reduktion der durch Glutamat vermittelten Apoptose.

1.3. WACHSTUMSFAKTOREN

1.3.1. Die Bedeutung der Neurotrophine im sich entwickelnden Gehirn

Wachstumsfaktoren sind ebenso wie die Zytokine Polypeptide, welche an transmembranäre Rezeptoren binden und eine spezifische, intrazelluläre Antwort auslösen. Der Begriff Zytokine wurde geprägt, um die Gruppe der immunmodulatorischen Proteine von den anderen, das Wachstum und die biologische Aktivität der nicht immunkompetenten Zellen und Gewebe modulierenden Wachstumsfaktoren abzugrenzen.

Zu der Familie der Wachstumsfaktoren gehören die Neurotrophine NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3, NT-4 und NT-5. Diese Neurotrophine spielen eine entscheidende Rolle für das Überleben und die Erhaltung der Neurone im sich entwickelnden Gehirn durch Regulierung der Apoptose (s. Kapitel 1.5.). Sie aktivieren diverse intrazelluläre Signale, die das Zellüberleben unterstützen. Die sich entwickelnden Neurone brauchen die trophische Unterstützung der Wachstumsfaktoren, daher kommt es bei einem Verlust der Neurotrophine zur Aktivierung des programmierten Zelltodes⁷⁸. Dabei gibt es die Hypothese, dass nur funktionierende Neurone mit korrekten synaptischen Verbindungen die Unterstützung von Wachstumsfaktoren erhalten⁷⁹. So wird durch diesen kontrollierten physiologischen Zelltod erreicht, dass die überflüssigen, funktionslosen Neurone eliminiert werden, um den Ablauf im funktionierenden Gewebe nicht zu stören.

Darüber hinaus haben diverse Studien gezeigt, dass Neurotrophine, vor allem NGF, BDNF und NT-3, die Neurone des ZNS bei einem hypoxischen/ischämischen Insult vor ihrem Zelltod schützen können. Diese protektive Wirkung konnte vorwiegend im neonatalen Gehirn von Ratten nachgewiesen werden^{80, 81}. In Kulturen schützt BDNF außerdem vor dem von Glutamat

vermittelten neuronalen Zelltod durch Blockierung des schädigenden Anstiegs des freien Ca^{2+} im Zytosol, das von toxischen Konzentrationen von Glutamat hervorgerufen wird⁸².

1.3.2. Wirkungswege der Neurotrophine

Neurotrophine binden und aktivieren Trk-Rezeptoren (Tyrosinkinaserzeptoren), TrkA, TrkB und TrkC, welche an der Zelloberfläche sitzen und eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen. Die Regulierung der Apoptose durch Neurotrophine geschieht durch die Aktivierung von Proteinkinasekaskaden, die über Schlüsselemente - wie zum einen die Phosphoinositol-3-Kinase (PI[3]K) und Akt und zum anderen über Shc und die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) - verlaufen (s. Abb.2)⁸³.

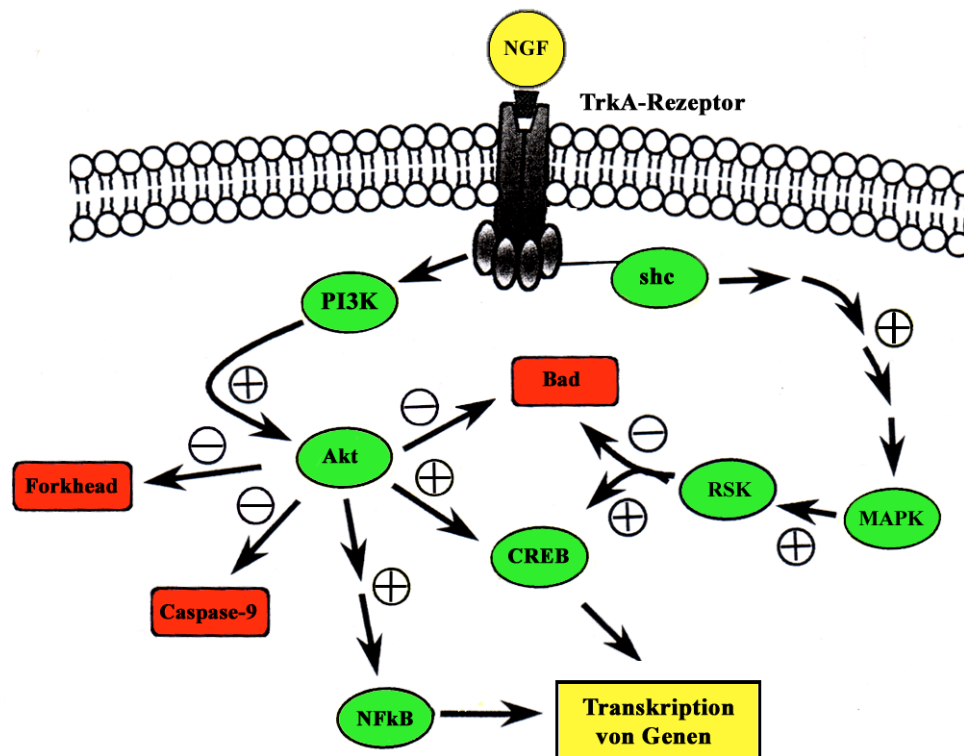


Abbildung 2: Signalwege des neuronalen Überlebens, induziert durch die Bindung von NGF an den TrkA-Rezeptor

Signaltransduktion über PI(3)K und Akt

Die Vermutung, dass die Signaltransduktion über PI(3)K eine zentrale Rolle beim Überleben der Neurone spielen könnte, kam auf, als man beobachtete, dass PI(3)K-Inhibitoren den

Überlebensseffekt von NGF blockieren⁸⁴. Die aktiven PI(3)K-Enzyme regulieren die Lokalisation und Aktivität einer Schlüsselkomponente im Zellüberleben, die Ser/Thr Kinase Akt⁸⁵. Akt hat verschiedene Schlüsselproteine als Ziel, die die Zelle überleben lassen. So zum Beispiel Bad, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, welches in unphosphorylierter Form Bcl-xL binden und so das Zellüberleben blockieren kann. Über Akt kommt es zur Phosphorylierung von Bad, sodass die proapoptotische Aktivität von Bad inhibiert wird⁸⁶. Darüber hinaus wirkt sich Akt direkt oder indirekt auf drei Transkriptionsfaktoren aus, welche alle in die Regulierung des Zellüberlebens involviert sind. Durch die Phosphorylierung von Forkhead durch Akt kommt es zu einer negativen Regulierung der den Zelltod fördernden Signale, während die Phosphorylierung von CREB (*cAMP response element binding protein*) und NF- κ B Überlebenssignale stimuliert^{87, 88}. Akt ist also eine potente Kinase, die auf verschiedenen Wegen die Neurone am Leben erhält.

Signaltransduktion über MAPK

Über den PI(3)K- und Akt-Weg hinaus wirken die Neurotrophine nach der Aktivierung des Trk-Rezeptors noch über andere Signaltransduktionswege. Sie stimulieren auch das Andocken von Shc an den aktivierten Trk-Rezeptor. Das triggert die Aktivierung des kleinen GTP-bindenden Proteins Ras und im Verlauf der Kaskade die Phosphorylierung und Aktivierung der Kinasen Raf und MAPK, bzw. ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*)⁸⁹. Die Effekte über den Weg der MAPK für das Zellüberleben werden zum großen Teil über die aktivierte pp90-ribosomal-S6-Kinase (RSK) vermittelt. Wie durch Akt wird Bad von RSK phosphoryliert und so in seiner proapoptotischen Aktivität inhibiert. Außerdem kommt es durch RSK zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB, welcher die Transkription von Bcl-2 steigert und das Zellüberleben direkt stimuliert.

Obwohl der Signalweg über PI(3)K-Akt und der MAPK-Signalweg nach dem Neurotrophinrezeptor unterschiedlich verlaufen, laufen sie schließlich in Bad und CREB zusammen, um das Apoptoseprogramm zu inhibieren⁸³.

Wie kommt es nun zum Absterben der Zelle durch die Abwesenheit von Neurotrophinen? Das Entfernen von NGF führt zu einer Abnahme der MAPK- und PI(3)K-Aktivität, gefolgt von einer ganzen Reihe früher Veränderungen wie einem Anstieg des reaktiven O₂, einem Abfall der Glukoseaufnahme und einem Abfall der RNA- und Proteinsynthese. In manchen Zellen kommt es nach einem NGF-Wegfall zum Anstieg von JNK (c-Jun N-terminal Kinase), was zu einer Aktivierung der neuronalen Apoptose führt⁹⁰.

Studien zeigen allerdings auch, dass Neurotrophine bzw. ihre Vorstufen, die so genannten Proneurotrophine, proapoptotische Wirkung besitzen. So ist z.B. ProNGF ein Ligand mit hoher Affinität für $p75^{\text{NTR}}$ und induziert $p75^{\text{NTR}}$ -abhängige Apoptose in Neuronenkulturen mit minimaler Aktivität von TrkA-vermittelter Differenzierung oder Zellüberleben.

Reife Neurotrophine binden selektiv an die Trk-Rezeptoren und fördern so das Zellüberleben, aber sie interagieren auch mit einer geringen Affinität mit dem strukturell deutlich unterschiedlichen Rezeptor $p75^{\text{NTR}}$. Obwohl $p75^{\text{NTR}}$ die Affinität und Spezifität der Trk-Neurotrophin-Interaktion erhöhen kann, induziert $p75^{\text{NTR}}$ auch Apoptose in Oligodendrozyten und Neuronen bei reduzierter oder fehlender Trk-Aktivität^{91, 92}.

1.3.3. Neurotrophine und Hyperoxie

In vitro Studien haben gezeigt, dass Hyperoxie apoptotische Neurodegeneration induzieren kann, welche Wachstumsfaktoren erfolgreich unterdrücken. Dabei wurde beobachtet, dass PC12h-Zellen (eine Subklonart von P12-Zellen) unter Hyperoxie (50% O₂) starben. Zum Zelltod kam es nicht, wenn Antioxidanzien dazugegeben wurden. In den abgestorbenen Zellen konnten DNA-Fragmente und Chromatinkugeln beobachtet werden, was den Schluss nahe legt, dass Hyperoxie via ROS (*reactive oxygen species*) zur Apoptose führt. Durch NGF konnte diese Apoptose durch Hochregulierung von Bcl-2 effektiv unterdrückt werden²⁷.

Des Weiteren zeigten *in vivo* Studien mit 2 Tage alten Ratten, die einer Hyperoxie (95% O₂) ausgesetzt wurden, dass Hyperoxie zu einer Abnahme der NGF-Konzentration im Gehirn und so zu vermehrter apoptotischer Neurodegeneration führte²⁸.

In vivo konnte eine protektive Wirkung von ERK, einem Teil der MAPK-Familie, bei DNA-Schädigungen und Apoptose infolge von Hyperoxie festgestellt werden. In einem Rattenmodell zur hyperoxischen Lungenschädigung zeigte sich, dass es über die aktivierte MAPK zu einem spezifischen Schutz gegen den durch Sauerstoff induzierten DNA-Strangbruch und Apoptose kam, welcher nicht auftrat bei Gabe eines Inhibitors der MAPK⁹³.

1.4. DIE PERIODE DES RAPIDEN HIRNWACHSTUMS („*BRAIN GROWTH SPURT PERIOD*“)

Das Säugerhirn durchläuft während seiner Entwicklung eine Phase des rapiden Hirnwachstums, die 1974 von Dobbing als „*brain growth spurt period*“ beschrieben wurde. Während dieser Phase spielen sich viele wichtige Vorgänge im Gehirn ab: Migration und Differenzierung von Nervenzellen, Synaptogenese, bei der Trillionen von synaptischen Verbindungen gebildet werden, wie auch die Eliminierung überflüssiger Neuronen, die durch zelluläre Vorgänge reguliert werden (s. Apoptose)^{94, 95}. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass das unreife Gehirn in der Periode des rapiden Hirnwachstums extrem anfällig ist für einen pathologisch erhöhten Neuronenuntergang als Reaktion auf verschiedene schädigende Einflüsse wie z.B. Hypoxie/Ischämie⁹⁶, Schädeltrauma^{97, 98} und pharmakologische Wirkstoffe^{99, 100}. Der Zeitraum, in der diese Periode stattfindet, unterscheidet sich bei den verschiedenen Spezies. Beim Menschen beginnt er im sechsten Schwangerschaftsmonat und endet zu Beginn des dritten Lebensmonats. Die Hirnwachstumsgeschwindigkeit während dieser Periode folgt einem sigmoidalen Kurvenverlauf, dessen Höhepunkt zum Zeitpunkt der Geburt erreicht ist. Demgegenüber umfasst die Periode des rapiden Hirnwachstums bei der Ratte die ersten drei postnatalen Lebenswochen mit einer maximalen Hirnwachstumsgeschwindigkeit zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag. Um Phänomene zu modellieren, die sich im menschlichen Gehirn während der Periode des rapiden Hirnwachstums abspielen, wird die Ratte während der vergleichbaren ontogenetischen Phase als Tiermodell benutzt^{94, 95}.

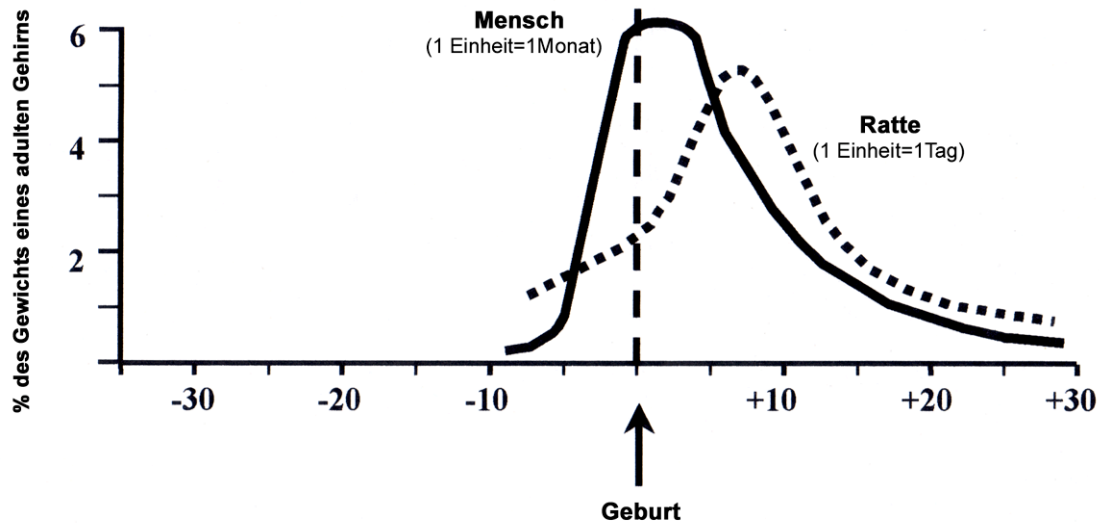


Abbildung 3: Die Periode des rapiden Hirnwachstums („*brain growth spurt period*“)

1.5. APOPTOSE

Im sich entwickelnden Gehirn sind der exzitotoxische Zelltod und vor allem die Apoptose die vorherrschenden Formen des Zelltods. Das Phänomen der Apoptose ist seit mehr als hundert Jahren bekannt¹⁰¹, doch erst seit den siebziger Jahren werden ihre Auslöser und ihre genetische Regulation systematisch untersucht. Die Apoptose ist ein sehr koordinierter und komplexer Vorgang, bei dem es zum Untergang und zur Entfernung unreifer oder geschädigter Neuronen kommt. Diese regulierte Selbstzerstörung der Zelle ermöglicht dem Organismus eine Kontrolle der Zellzahl und schützt ihn so vor „überflüssigen“ Zellen, die das Funktionsgleichgewicht stören würden¹⁰². Die Apoptose der Neuronen formt also das sich entwickelnde Gehirn durch diese Art des kontrollierten physiologischen Zelltods. Die im Rahmen der Hirnentwicklung im Überschuss produzierten Neurone werden so auf ungefähr die Hälfte ihrer Ausgangszahl reduziert. Auf allen Stufen der neuronalen Reifung kann der programmierte Zelltod nachgewiesen werden, am häufigsten sind jedoch reife Neurone betroffen, die bereits über Verbindungen zu afferenten und efferenten Zellen verfügen¹⁰³. Die Apoptose spielt aber ebenso eine wichtige Rolle bei akuten und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen. Getriggert

wird die Apoptose unter anderem durch den Verlust von Wachstumsfaktoren, DNA-Schädigungen, Zytokinproduktion, Aktivierung von Todesrezeptoren und die Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma^{83, 104, 105}. Im Folgenden werden nur einige wenige Aspekte herausgegriffen.

1.5.1. Morphologische Kennzeichen der Apoptose

Kennzeichnend für den apoptotischen Zelltod sind eine primäre DNA-Fragmentation in ca. 180 Basenpaar große Stücke, die Kondensation von Nukleoplasma und Zytoplasma, Bildung apoptotischer Körperchen und Phagozytose dieser Körperchen, ohne dass es zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zellbestandteile kommt. Eine Entzündungsreaktion in der Umgebung bleibt aus. Diese morphologischen Veränderungen wurden zum ersten Mal von Kerr und Mitarbeitern in Leberzellen beschrieben¹⁰⁶.

Ishimaru et al.¹⁰⁷ studierten am Gehirn zwei Tage alter Ratten den Ablauf der ultrastrukturellen Veränderungen von Neuronen, die im Rahmen der physiologischen Apoptose degenerierten. Die ersten Veränderungen werden im Nukleoplasma sichtbar. Die ursprünglich homogene Masse verklumpt und flockt aus. Es bilden sich Chromatinkugeln, indem sich „Chromatinklumpen“ aneinander legen. Parallel dazu zerfällt die Kernmembran, sodass Zyto- und Nukleoplasma sich vermischen können. Dadurch verteilen sich die Chromatinkugeln aus dem Nukleus in der ganzen Zelle. Der Aufbau der Kernmembran aus zwei Schichten bleibt weiterhin erkennbar.

Die Organellen des Zytoplasmas bleiben weitgehend unbeeinträchtigt von diesen Vorgängen, lediglich die Mitochondrien schwellen etwas an. Zuletzt schnürt die Zelle Zellfragmente, die sogenannten *apoptotic bodies*, ab, die im Neuropil verbleiben und dort abgebaut werden.

Anhand dieser morphologischen Kriterien kann man die Apoptose von der Nekrose, der anderen wichtigen Form des Zelltodes, abgrenzen.

1.5.2. Die genetische Regulation der Apoptose

Die apoptotische Zelltodkaskade wird von einem intra- oder einem extrazellulären Triggerfaktor in Gang gesetzt, dementsprechend spricht man vom extrinsischen oder intrinsischen Weg. Beide führen letztlich über Aktivierung der Caspasen zum Zelltod. Die meisten der von Kerr et al.¹⁰⁶ beobachteten morphologischen Veränderungen werden verursacht durch eine Gruppe von Cysteinproteasen, die vor allem in apoptotischen Zellen aktiviert sind. Diese homologen Proteasen sind Teil einer großen Proteinfamilie und bekannt als Caspasen. Sie spielen die zentrale Rolle bei der Zerstörung der Zelle. Tatsächlich kann durch Elimination der

Caspaseaktivität (durch Mutation oder pharmakologische Hemmstoffe) die Apoptose verlangsamt oder sogar ganz aufgehalten werden¹⁰². Caspasen können anhand einer Sequenz in ihrer Pro-Domäne klassifiziert werden. Caspasen mit einer „Todeseffektordomäne“, wie Caspase-8 und Caspase-10, werden aktiviert durch die Interaktion mit der intrazellulären Domäne von Todesrezeptoren (z.B. Fas/CD 95/Apo-1 oder TNF-Rezeptoren). Caspasen mit CARDs (*caspase activating recruitment domains*) wie Caspase-1, -2, -4, -5, -9, -11 und -12 werden meist durch einen intrazellulären Komplex aktiviert, beispielsweise durch den Zytochrom C/Apaf-1/Caspase 9-Komplex¹⁰⁸.

Durch die Bindung eines Liganden an den so genannten Todesrezeptor Fas (Apo-1, CD 95) kommt es zur Aktivierung des extrinsischen Weges. Dieser Rezeptor sitzt an der Zelloberfläche und gehört zur TNF(Tumor-Nekrose-Faktor)-Familie. Über die Aktivierung der Caspase-8 kommt es zum Zelltod^{109, 110, 111}.

Apoptose durch DNA-Strangbrüche bei Bestrahlung¹¹², Entzug des Wachstumsfaktors NGF¹¹³ oder Zellschädigungen durch freie Radikale im Rahmen von Hyperoxie¹¹⁴ sind Beispiele für die Aktivierung des intrinsischen Weges. Dabei kommt es zur Ausschüttung von Zytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Dort bindet es sich an Apaf-1, wodurch es zur Aktivierung der Caspase-9 und damit der apoptotischen Kaskade kommt¹¹⁵. In der Folge werden verschiedene Proteinkinasen aktiviert und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Beispielfhaft seien hier die c-Jun N-terminal-Kinasen (JNKs) erwähnt. Diese Enzyme phosphorylieren nach ihrer Aktivierung den Transkriptionsfaktor c-Jun, der nun seinerseits die Transkription proapoptotischer Gene auslöst¹¹⁶. In dieser Kaskade ist auch eine intrazelluläre Kontroll- und Modifikationsphase enthalten, in der die Proteine der Bcl-Familie eine Schlüsselrolle spielen¹¹⁷. So kommt es über Wachstumsfaktoren (*growth factors*) zu einer gesteigerten Aktivität von CREB (*cAMP responsive element binding protein*), Bcl-xL und Bcl-2, was eine Ausschüttung von Zytochrom C aus den Mitochondrien und damit den intrinsischen Weg der Apoptose verhindert.

Über die verschiedenen Caspasen kommt es schließlich zur Zellschrumpfung, Membranschwellung, DNA-Fragmentation und zur Verhinderung der DNA-Reparation, was schließlich zum Zelltod führt¹¹⁸.

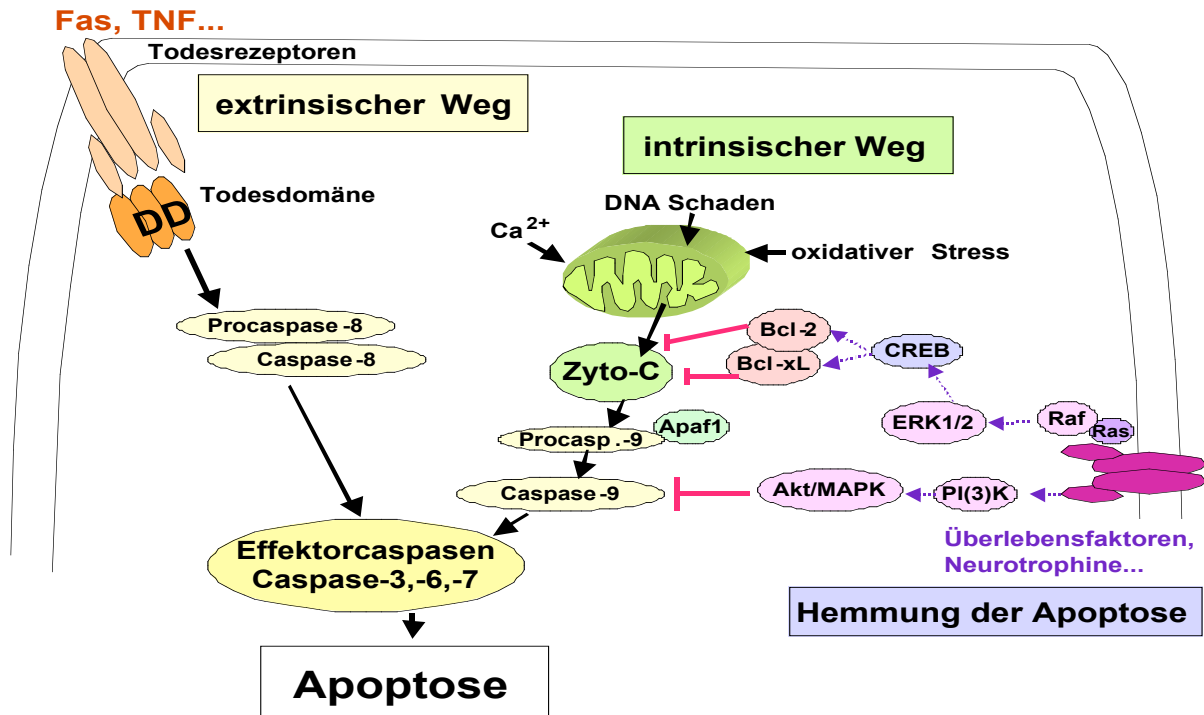


Abbildung 4: Die apoptotische Kaskade

1.6. FORMULIERUNG DER ZENTRALEN FRAGESTELLUNG

In der Einleitung wurde beschrieben, dass die hohe Inzidenz von bleibenden motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen von Frühgeborenen nicht ausreichend erklärt werden kann. Es wurde auch der Zusammenhang zwischen Hyperoxie und apoptotischen Vorgängen in den Neuronen des sich entwickelnden Gehirns dargestellt, wie auch die Wirkungsmechanismen der Wachstumsfaktoren und Zytokine.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist nun, wie sich ein erhöhtes Sauerstoffangebot auf das unreife Gehirn auswirkt und welchen Einfluss es auf die Expression von apoptotischen Genen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen hat.

Dazu wurde ein Tierversuchsmodell mit 6 Tage alten Ratten entwickelt, um den Zusammenhang zwischen Hyperoxie, Apoptose und deren regulierenden Faktoren und inflammatorischen Prozessen im sich entwickelnden Gehirn zu untersuchen.

2. Material

2.1. GERÄTE UND HILFSMITTEL

ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (TaqMan-PCR-Cycler)	Applied Biosystems, Darmstadt
Blotting Box	Biometra, Göttingen
Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Entwicklungsmaschine X-OMAT 5000RA	Kodak, Stuttgart
Feinwaage MC 210 S	Sartorius, Göttingen
GelBond®PAG Film (21.0 x 21.3cm)	Serva, Heidelberg
Geldokumentationssystem BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen
Gene Quant II RNA/DNA Calculator Pharmacia	Biotech, Freiburg
Horizontales Elektrophoresesystem Easy-Cast™	AGS, Heidelberg
Hybridisierungssofen	OV 3Biometra, Göttingen
Hypercassette™	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm™ ECL	Amersham Bioscience, Freiburg
Kamera (Lichtmikroskop) Olympus PM-C35DX	Olympus, Hamburg
Konzentrator T 301	Eppendorf, Hamburg
Leuchtkasten	Roth, Karlsruhe
Lichtmikroskop Olympus BX60	Olympus, Hamburg
Magnetrührer MR3001	Heidolph, Kehlheim
Mikrowellenherd (Modell M 706)	Philips, Hamburg
Mikroplattenreader	Perkin Elmer, Weiterstadt
Mikrotom HM 360	Microm International GmbH, Walldorf
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham International, Bucks, UK
PCR-Thermocycler Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Perfect Western™ (Inkubationsbox)	GenHunter, Nashville, TN, USA
pH-Meter GPHR 1400A	Greisinger, Regenstauf
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL®	Hellma, Mühlheim

Rotationsvibrator VT 1000 S	Leica Microsystem, Nussloch
Schüttelinkubator Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Spacer	Diagen, Hilden
Spektralphotometer Ultraspec® III	Pharmacia, Freiburg
Stereotaktisches Gerät	David Kopf Instruments, Tujunga, USA
Stromversorgungsgerät EPS 3500	Pharmacia, Freiburg
Taumel-Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen
TGGE-Gelkammer für Polyacrylamidgele	Diagen, Hilden
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermostat KH-3	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5415C und 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot-SD-System	Bio-Rad Laboratories, München
Trockenschrank B12	Heraeus, Hanau
UV-Transilluminator TI 1	Biometra, Göttingen
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortexgerät Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage BL 1500 S	Sartorius, Göttingen

2.2. CHEMIKALIEN

3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose (ultra pure)	Gibco BRL, Eggenstein
Allantoin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumhydroxid	Fluka, Buchs, Schweiz
Aprotinin	Fluka, Buchs, Schweiz
APS	Serva, Heidelberg
Aqua-Spüllösung	Delta-Pharma, Pfullingen
Azur B	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs/Schweiz

Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
chirurgisches Instrumentarium	Aesculap, Tuttlingen
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coumarin-Säure	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAB	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Promega, Madison, USA
DMSO	Fluka, Buchs, Schweiz
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt und unvergällt)	Merck, Darmstadt
Ether zur Narkose ASID [®]	ASID Bonz, Böblingen
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (37%ige Lösung)	Riedel-de Haën, Seelze
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Glycogen	Boehringer, Mannheim
Heparin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumferrizyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kupfernitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Serva, Heidelberg
Luminol	Fluka, Buchs, Schweiz
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mayers Häkalaun	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylgrün	Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma, St. Louis, USA
Natriumcarbonat	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligo-d(T)-Primer	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Lösung	Gibco, Paisley, Schottland
Pepstatin A	Fluka, Buchs, Schweiz
Permunt Mounting Medium	EMS, Fort Washington, USA
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyridin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti [®] -Phenol/Chloroform-Lösung	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure (65%)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (37%, rauchend)	Merck, Darmstadt
Sigmacote [®]	Sigma, St. Louis, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
Silan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, St. Louis, USA
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

2.3. HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Blotting-Transferpuffer	0,04M Tris, 0306M Glycin 20% (v/v) Ethanol, 0,1% SDS
Boratpuffer (pH 8,5)	20mM Borsäure 50mM Natriumtetraborat
Coumarinsäure Stammlösung	90mM Coumarinsäure (in DMSO)
DNA-Probenpuffer (für Agarosegele)	0,1% (w/v) Bromphenolblau 10mM EDTA (pH 8,0) 60% (v/v) Glycerin 100mM Tris-HCl (pH 8,0)
DNA-Probepuffer (für Polyacrylamidgele)	0,1% (w/v) Bromphenolblau 10mM EDTA (pH 8,0) 60% (v/v) Glycerin 100mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1% (w/v) Xylencyanol
ECL-Lösung 1	2,5mM Luminol, 0,4mM p-Coumarsäure 100mM Tris-HCl (pH 8,5)
ECL-Lösung 2	100mM Tris-HCl (pH 8,5)
1% Essigsäurelösung	5ml 100% Essigsäure ad 500ml Bidest-H ₂ O
Fixierungslösung II (4% Paraformaldehydlösung, pH 7,4)	4% (w/v) Paraformaldehyd 0,1% Natriumcacodylat 0,9% (w/v) Natriumchlorid
Heparinlösung	0,17% (v/v) Heparin in 1x PBS
Kupfer-Silber-Lösung (DeOlmos Kupfersilberfärbung)	1,5g Silbernitrat, 3ml 0,5%ige Kupfernitratlösung, 15ml 0,1%ige Allantoinlösung, 9ml Boratpuffer, 17ml Ethanol, 9ml Pyridin
Laemmli-Puffer	2ml 0,625 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,2g SDS, 5ml Glycerin 0,5ml β -Mercaptoethanol, 0,1ml Bromphenolblau, ad 10ml Bidest-H ₂ O
10 x Laufgelpuffer (für Blotting-Elektrophorese)	72g Glycerin, 15,15g Tris, 5g SDS,

	ad 500ml Bidest-H ₂ O
Luminol Stammlösung	250mM Luminol (in DMSO)
Lysepuffer, pH 7,6 (Extraktionspuffer)	50mM Tris, 166mM KCL 5mM EDTA, 1% Triton X-100
Magermilchlösung	2,5g Magermilchpulver ad 50ml TBS-T
Natriumcarbonatlösung 0,3M	59,36g Na ₂ CO ₂ , 0,968ml Formalin, ad 2000ml Bidest-H ₂ O
PAGE-Laufpuffer	90ml 10 x TBE-Puffer, 50ml Glycerin, ad 1000ml Bidest-H ₂ O
PAGE-Lösung	12,6g Glycerin, 18ml 10x TBE-Puffer (pH 8,3), 25ml 40% Acrylamid, 147ml Bidest-H ₂ O
PCR-H ₂ O	Bidest-H ₂ O autoklaviert
Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Puffer	5% (v/v) Glycerin, 0,9x TBE
10x Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Puffer (Western Blot)	0,192M Glycin, 0,1% SDS, 25mM Tris-HCl (pH 8,1)
5x Reaktionspuffer (DNase I-Behandlung und Reverse Transkription)	50mM DTT, 0,375M Kaliumchlorid, 15mM Magnesiumchlorid, 0,25M Tris-HCl (pH 8,3)
Reduktionslösung (DeOlmos Kupfersilberfärbung)	0,007% (w/v) Citronensäure, 10% (v/v) Ethanol, 0,04% (v/v) Formaldehyd
2 % Salpetersäure	15ml 65% Salpetersäure, ad 500ml Bidest-H ₂ O
4 x Sammelgelpuffer, pH 6,8	30,3g Tris, 2g SDS, ad 500ml Bidest-H ₂ O
Silberdiaminlösung (DeOlmos Kupfersilberfärbung)	0,13M Ammoniumhydroxid 0,1% (w/v) Natriumhydroxid 10% (w/v) Silbernitrat
0,2% Silbernitratlösung	0,6g Silbernitrat, ad 300ml Bidest-H ₂ O
Strippingpuffer	0,1M β -Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) SDS, 62,5mM Tris-HCl (pH 6,8)
10 x TAE-Puffer, pH 7,7	10mM EDTA (pH 8,0), 2,3% (v/v) Essigsäure, 0,5M Tris
10 x TBE-Puffer, pH 8,3	1M Borsäure, 20mM EDTA, 0,5M Tris
10 x TBS	0,1M Tris-HCl (pH 7,4), 1,5M Natriumchlorid

0,1 % TBS-Tween	100ml 1x TBS, 1ml Tween 20, ad 1000ml Bidest-H ₂ O
4 x Trenngelpuffer	90,8g Tris, 2g SDS, ad 500ml Bidest-H ₂ O
Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung (TUNEL-Färbung)	75% (v/v) Methanol, 0,75% (v/v) Wasserstoffperoxid

2.4. KITS

ABC Kit	Vector Laboratories, Peterborough, England
ApopTag® <i>In Situ</i> Apoptosis Detection Kit	Oncor Appligene, Heidelberg
Bicinchoninic Acid Kit	Interchim, Cedex, Frankreich
RNAClean™	AGS, Heidelberg

2.5. ENZYME

AmpliTaQ® DNA Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
DNase I, RNase-frei	Boehringer, Mannheim
M-MLV-Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Rnasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim

2.6. ANTIKÖRPER

Akt (polyklonaler Kaninchen-Antikörper)	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
p-Akt (polyklonaler Kaninchen-Antikörper)	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Caspase-3 Antikörper	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
p-MAPK (polyklonaler Kaninchen-Antikörper) (p-ERK1/2)	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
MAPK (monoklonaler Maus-Antikörper) (ERK1/2)	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Fas (monoklonaler Maus-Antikörper)	Transduction Laboratories, Heidelberg

2.7. OLIGONUKLEOTIDE

2.7.1. Oligonukleotide für die reverse Transkription

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Promega, Mannheim

2.7.2. Oligonukleotide für die semiquantitative PCR

Die verwendeten, synthetischen Oligonukleotide wurden vom Biochemisch-Technologischen Zentrum (BioTeZ) in Berlin-Buch bezogen.

Die Sequenzen der folgenden Oligonukleotide wurden aufgrund von Veröffentlichungen ausgewählt bzw. mittels Software Primerdesign 4.0 selbst entworfen. Die verwendeten Primer erfüllen dabei bestimmte Kriterien:

- sie haben eine gewisse Nukleotidlänge,
- der G/C-Gehalt liegt zwischen 50 und 60%,
- sie weisen eine bestimmte Schmelztemperatur auf,
- kein Auftreten von unerwünschten Sekundärstrukturen (Haarnadelstrukturen und Primer-dimeren).

Name	Sequenz (5'-3')	Genbank Acs.No.	Produkt	Position
<u>Apoptotische Gene</u>				
Fas		D26112	227bp	
Sense-Primer	CCGACAACAACCTGCTCAGA			174-192nt
Antisense-Primer	GCACCTGCACTTGGTATTC			412-430nt
<u>Wachstumsfaktoren</u>				
BDNF		D10938	491bp	
Sense-Primer	CGACGTCCCTGGCTGACACTTTT			2296-2316nt
Antisense-Primer	AGTAAGGGCCCGAACATACGATTGG			2762-2786nt
Neurotrophin-3		M34643	484bp	
Sense-Primer	GGTCAGAATTCCAGCCGATGATTGC			308-332nt
Antisense-Primer	CAGCGCCAGCCTACGAGTTTGTGTGT			767-791nt
NGF		M36589	491bp	
Sense-Primer	CTGAACCAATAGCTGCCCCGTGTGAC			456-480nt
Antisense-Primer	GGCAGCCTGTTTGTCTGTCTGTTGTC			922-946nt
GDNF		L15305	654bp	
Sense-Primer	CGGGACTCTAAGATGAAGTT			38-57nt
Antisense-Primer	CCAGGGTCAGATACATCCAC			672-691nt

Zytokine

IL-1β	NM_031512	335bp	
Sense-Primer	GACAGAACATAAGCCAACAAG		522-542nt
Antisense-Primer	GTCAACTATGTCCCGACCATT		836-856nt
IL-10	NM_012854	352bp	
Sense-Primer	CAATAACTGCACCCACTTCC		125-144nt
Antisense-Primer	ATTCTTCACCTGCTCCACTGC		456-476nt
IL-18	NM_019165	398bp	
Sense-Primer	TGGAGACTTGGAATCAGACC		90-109nt
Antisense-Primer	GGCAAGCTAGAAAGTGTCTCT		468-487nt

Interner Standard (*housekeeping gene*)

<u>-Actin</u>	V01217	897bp	
Sense-Primer	CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG		1663-1687nt
Antisense-Primer	GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG		2535-2559nt

2.8. MOLEKULARGEWICHTSMARKER

PhiX174 DNA/Hae III Marker	Promega, Mannheim
RNA-Molekulargewichtsmarker 0.28–6.58kb	Promega, Mannheim

2.9. TIERE

Als Versuchstiere wurden sieben Tage alte Wistar-Ratten (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, BgVV, Berlin) verwendet.

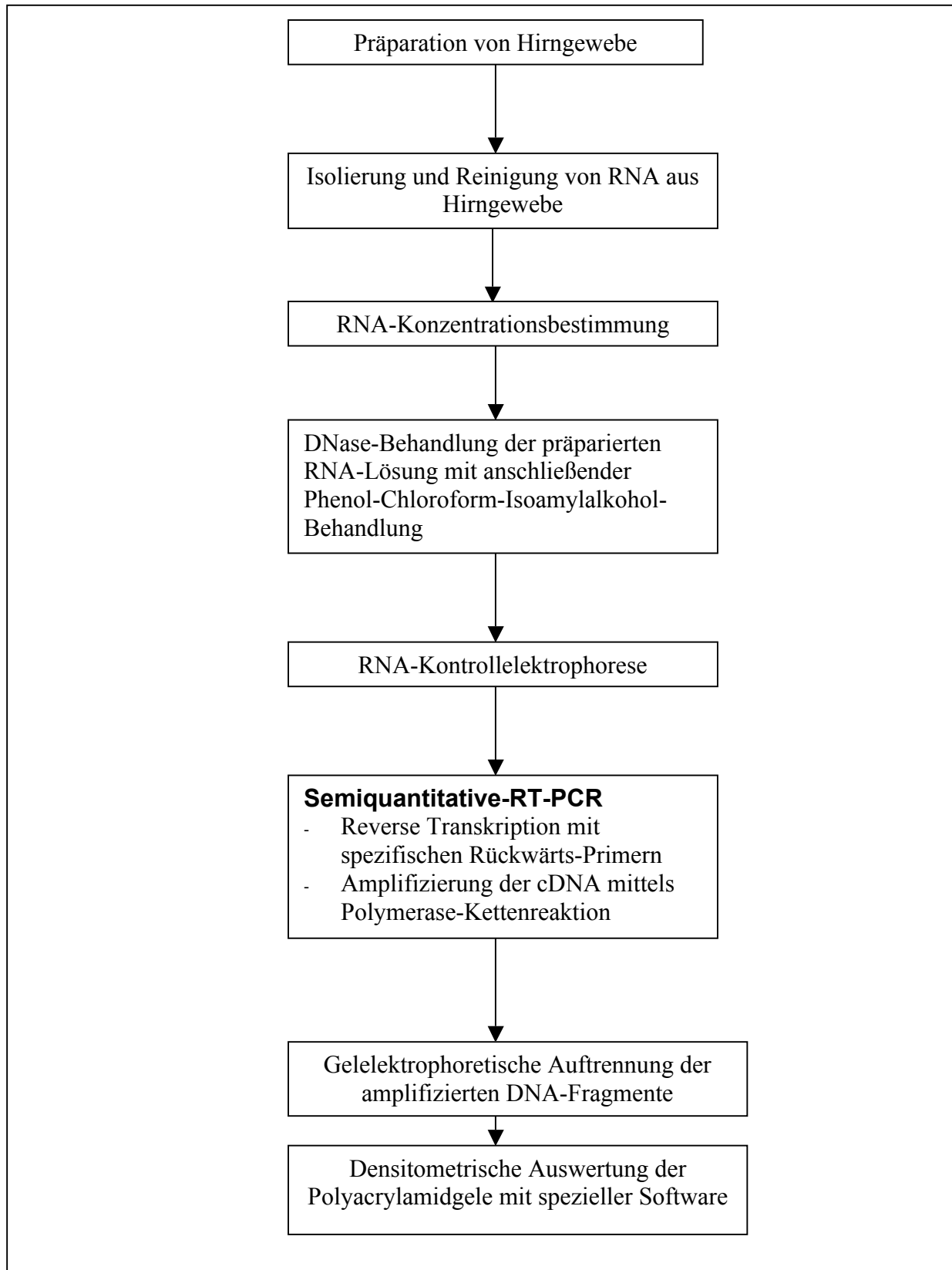
Die Jungtiere befanden sich zu jedem Zeitpunkt bei dem Muttertier, um Stressbedingungen der Versuchstiere zu minimieren und einer Hypothermie vorzubeugen. Die Wurfgröße lag zwischen 10 und 15 Versuchstieren.

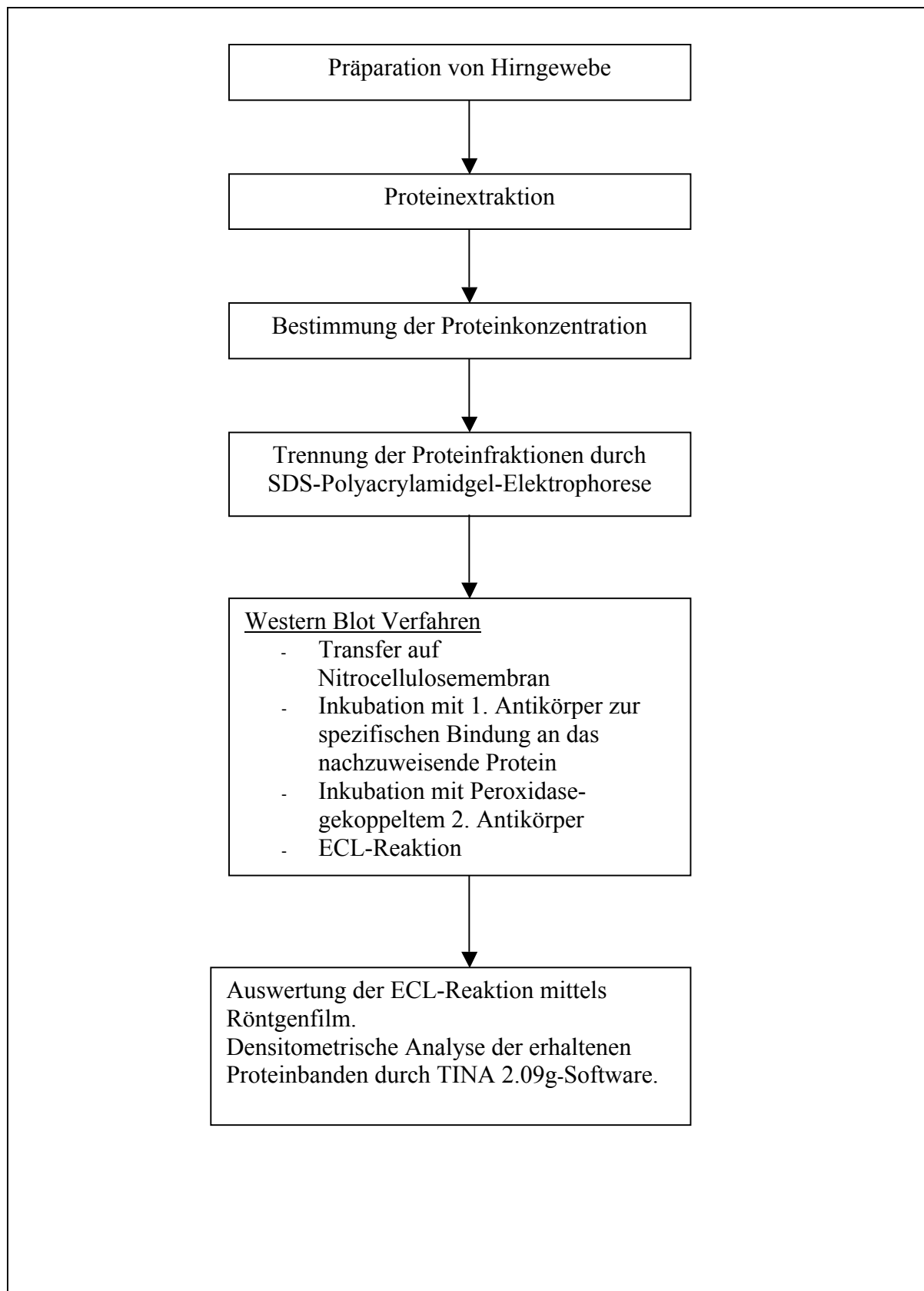
2.10. SOFTWARE UND DATENBANKEN

Bezeichnung	Bezugsquelle bzw. Internetadresse
ABI PRISM [®] 7000 Sequence Detection System Software	Applied Biosystems, Darmstadt
Adobe [®] Photoshop [®] Elements 2.0	Adobe Systems, Unterschleißheim
Assay by Design File Builder 2..0	Applied Biosystems, Darmstadt
BioDocAnalyze	Whatman Biometra, Göttingen
Ensembl Genome Viewer Datenbank	http://www.ensembl.org
GraphPad PRISM [™] Version 3.0	GraphPad Software, San Diego, USA
NCBI Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST
Primer Designer 4.0	Scientific&Educational Software, Durham, USA
StarOffice 6.0	Sun Microsystems, Santa Clara, USA
TINA Version 2.09g	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt

3. Methoden

3.1. FLUSSDIAGRAMM DER VERWENDETEN METHODE RT-PCR



3.2. FLUSSDIAGRAMM DER VERWENDETEN METHODE WESTERN BLOT

3.3. TIERVERSUCHE: TIERE, VERSUCHSAUFBAU, TIERSCHUTZ

Wistar-Ratten im Alter von 6 Tagen, geliefert vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Berlin), wurden für die durchgeführten Versuche eingesetzt. Zusammen mit ihren Müttern wurden die 11–15g schweren Tiere in einen Käfig mit Wasser und Nahrung gesetzt. Für die Inkubation unter hyperoxischen Bedingungen wurden sie aus diesem Käfig mit dem Muttertier entnommen und bei Wasser und Nahrung in einem ehemaligen Transportinkubator (s. Abb.5) für neugeborene Kinder bei einer Sauerstoffkonzentration von 80% gehalten. Die Sauerstoffkonzentration wurde dabei ständig kontrolliert. Die Kontrolltiere wurden bei Raumluft gelassen.

Bei jedem Versuch wurden pro Zeiteinheit sechs Tiere eingesetzt und zusätzlich sechs Kontrolltiere. Die gewählten Zeiteinheiten, die die Tiere bei 80% Sauerstoffkonzentration verbrachten, lagen bei 2, 6, 12, 24, und 48std.

Die Tiere erlebten in ihren Käfigen einen Tag- und Nacht-Rhythmus von Licht und Dunkelheit.

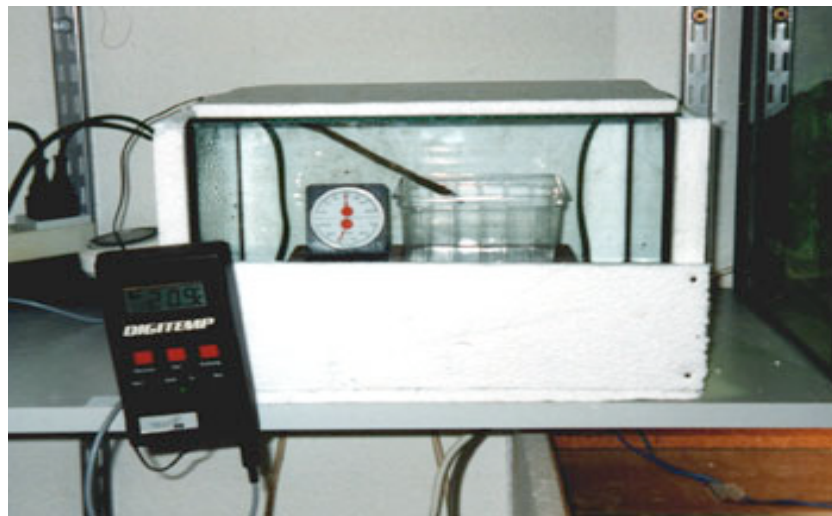


Abbildung 5: Transportinkubator mit O₂-Messgerät zur Überwachung der Sauerstoffkonzentration

3.4. PRÄPARATION VON HIRNGEWEBE

3.4.1. Präparation für molekularbiologische Untersuchungen

Die Tiere, die dem Sauerstoff ausgesetzt waren, sowie die Kontrolltiere wurden zunächst mit Ether narkotisiert und dann mit einer scharfen Schere dekapitiert. Die Kalotte wurde aufgeschnitten und das Gehirn entnommen. Folgende Hirnregionen der jeweils rechten und linken Hemisphäre wurden präpariert:

- Hippocampus
- Thalamus
- Striatum
- Retrosplenialer Kortex (RSC)
- Cortex parietalis
- Basalregion

Die Gewebeproben wurden in 2,0ml-Reaktionsgefäßen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

3.4.2. Perfusion und Präparation für histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Tiere, die histologisch und immunhistochemisch untersucht werden sollten, wurden nach den bestimmten Zeiteinheiten (2, 6, 12, 24, 48std) in 80%iger Sauerstoffkonzentration mit einer Überdosis Chloralhydrat getötet. Anschließend wurde der Thorax geöffnet, und über eine in die Aorta vorgeschobene Kanüle erfolgte die intrakardiale Perfusion. Zunächst wurden die Ratten mit einer eiskalten Heparinlösung für 15min perfundiert, worauf eine weitere Perfusion für 30min mit eiskalter Fixierungslösung II folgte.

Nach der Perfusion wurde jeweils die Kalotte mittels vorsichtiger Schnitte entlang der Sagittalnaht geöffnet, das Gehirn mit einem Spatel entnommen, gewogen und in Fixierungslösung II für 4std bei 4°C nachfixiert. Anschließend erfolgten die DeOlmos Kupfersilberfärbung bzw. TUNEL-Färbung und die immunhistochemische Untersuchungen.

3.5. RT-PCR

3.5.1. Isolierung und Reinigung von RNA aus Hirngewebe

Die Isolation der RNA aus dem Gewebe erfolgte mittels einer sauren Guanidin-Isothiocyant-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode¹¹⁹ mit dem RNA-CleanTM-Reagenz.

Pro 100mg tiefgefrorenem Gewebe wurde 2,0ml RNA-CleanTM-Lösung zugefügt. Das Gewebe wurde zunächst gelöst und dann so lange gevortext, bis es vollständig homogenisiert war.

Im Anschluss daran folgte die Extraktion der RNA. Dafür wurden 1/10 Volumina Chloroform, bezogen auf das Volumen der eingesetzten RNA-CleanTM-Lösung, zugegeben. Nach dem Vortexen der Proben für 20s folgte für 5min eine Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Proben bei 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (15min, 12.000xg). Danach wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt, 15min bei -20°C inkubiert und danach erneut bei 4°C zentrifugiert (15min, 12.000xg). Zur Reinigung der gefällten RNA wurde der Überstand abpipettiert, das RNA-Pellet mit 190 µl 70% Ethanol gewaschen und bei 4°C für 8min zentrifugiert (7.6000xg). Dieser Reinigungsschritt wurde wiederholt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet etwa 20min luftgetrocknet. Zur Entfernung von Restethanol wurden die Reaktionsgefäße anschließend offen für 5min bei 60°C inkubiert. Danach folgte die Resuspendierung der erhaltenen RNA mit 50µl PCR-H₂O. Anschließend wurden die Proben nochmals bei 60°C für 5min inkubiert, gemischt, zentrifugiert und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration¹²⁰ und Reinheit der Präparation wurde die Absorption der jeweiligen RNA-Lösung bei 260 und 280nm im Spektralphotometer ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen bei 260nm. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine OD-Ratio von 1,0 einer RNA-Konzentration von 40µg/ml.

Proteine zeigen aufgrund ihrer aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum bei 280nm. Der Wert des Quotienten aus der Absorption bei 260nm und 280nm (*ratio*) sollte bei einer kontaminationsfreien RNA-Lösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.5.3. DNase-Behandlung der präparierten RNA-Lösung mit anschließender Phenol-

Chloroform-Isoamylalkohol-Behandlung

RNA-Präparationen weisen oft eine Kontamination mit DNA auf. Da diese Verunreinigung mit DNA weitere Experimente beeinträchtigen und Ergebnisse verfälschen kann, mussten die erhaltenen RNA-Lösungen gereinigt werden. Dies erfolgte enzymatisch durch Behandlung mit einer RNase-freien DNase I und anschließender PCI-Fällung.

Ansatz: 5µg RNA
10µl RT-Puffer
5µl DNase I (10U/_l)
ad 50µl PCR-H₂O

Der Ansatz wurde 1std bei 37°C und anschließend 5min auf Eis inkubiert. Die Extraktion der RNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Behandlung (PCI-Behandlung). Zum Ansatz wurde 1 Volumen Roti®-Phenol-Chloroform-Lösung gegeben und anschließend in einer Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert (2min, 14.000xg). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform versetzt und analog zentrifugiert. Zur Fällung der RNA wurde die obere wässrige Phase erneut abgenommen, 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) sowie 0,5µg Glykogen (20_g/_l) zugegeben und gut gemischt. Dieser gesamte Ansatz wurde mit 3 Volumina 96% (v/v) Ethanol versetzt, sorgfältig gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt.

Am folgenden Tag wurde der Ansatz in einer Tischzentrifuge 20min bei 14.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet 15min an der Luft getrocknet und in 22µl PCR-H₂O resuspendiert. Die RNA-Konzentration und Reinheit der Probe wurden photometrisch, wie unter Punkt 3.5.2 beschrieben überprüft.

3.5.4. RNA-Kontrollelektrophorese

Zur Überprüfung der Integrität und der Kontaminationsfreiheit wurde die RNA einer 1%-Agarosegel-Elektrophorese unterzogen.

1% Agarosegel: 1g Agarose
10ml 10x TAE-Puffer
ad 100 ml Bdest-H₂O

Zur Kontrollelektrophorese wurden jeweils 500ng RNA aufgetragen.

Beispiel für Probenvorbereitung: 0,5µl RNA
1,0µl 10x DNA-Probepuffer, pH 8,0

8,5µl PCR- H₂O

Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen wurden die Proben vor dem Auftragen 10min bei 70°C erhitzt und dann kurz zuvor auf Eis gestellt. Als Laufpuffer der Elektrophorese wurde 1x T-Puffer, pH 7,7 verwendet. Die aufgetragenen Proben wurden zunächst 10min bei 50V laufen gelassen und anschließend für 30–40min bei 100V.

Die Färbung der Proben erfolgte für 40min in Ethidiumbromid. Ethidiumbromid interkaliert als organischer Fluoreszenzfarbstoff in Nukleinsäuren. Es wird durch UV-Licht angeregt und emittiert Licht im orangeroten Bereich.

Um weitere Sicherheit über die DNA-Freiheit der RNA zu erhalten, wurde eine Negativkontrolle der RT-PCR durchgeführt, wobei in der PCR nicht revers transkribierte RNA eingesetzt wurde.

3.5.5. Semiquantitative RT-PCR: Theoretische Aspekte

Es existieren zahlreiche molekularbiologische Methoden zur Analyse von RNA, u.a. Northern Blot, In-situ-Hybridisierung und der RNase-Protection-Assay. Diese sind jedoch sehr zeitintensive Methoden und bei schwachen Transkripten aufgrund ihrer geringen Sensitivität ungeeignet. Mit der Möglichkeit, das Prinzip der reversen Transkription zu nutzen, begann man auch RNA-Moleküle mit der PCR-Technologie zu amplifizieren, und es wurde die sensitive Methode der Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) entwickelt. Mit der RT-PCR kann also die Genexpression auf mRNA-Ebene analysiert werden.

Da die Taq-Polymerase einzelsträngige RNA nicht als Matrize erkennen kann, muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, die zur Ausgangs-RNA einen komplementären DNA-Strang (cDNA) bildet. Dieser cDNA-Einzelstrang wird durch die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) bei 72°C zum Doppelstrang vervollständigt. Da die Taq-Polymerase leicht die Denaturierungstemperatur von 94°C übersteht, kann in einer Reaktion durch zyklische Veränderungen der Temperatur eine exponentielle Zunahme der DNA erreicht werden. Erst nach Verbrauch der Nukleotide oder der Primer wird eine Plateauphase erreicht. Die Spezifität dieses Verfahrens wird durch die Primer bedingt.

Um Mengenabschätzungen der Expression spezifischer mRNAs vorzunehmen, kann das Prinzip der internen endogenen Standardisierung genutzt werden. Dabei wird die mRNA eines so genannten Housekeeping-Gens zusätzlich zum zu untersuchenden Gen revers transkribiert und in der PCR coamplifiziert. Als „Housekeeping-Gene“ bezeichnet man Gene, die in jeder Zelle und

zu jeder Zeit in gleichem Maße exprimiert werden. Das Signal nach der Amplifikation ist demnach konstant. Indem man das Signal des zu untersuchenden Gens ins Verhältnis zu dem des „Housekeeping-Gens“ setzt, können semiquantitative Abschätzungen vorgenommen werden. Wichtig bei der Auswahl eines internen Standards ist, dass das Transkriptionsniveau bei den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht variiert.

Der verwendete Standard in der RT-PCR bei dieser Arbeit war β -Actin, da das β -Actin-Gen die oben genannten Bedingungen erfüllte.

Da die Amplifikation im Verlauf der PCR nicht linear sondern über eine exponentielle Phase und eine Plateauphase verläuft, ist eine Quantifizierung erschwert. Schon kleinste Schwankungen, z.B. unterschiedliche Inhibition von Proben, beeinflussen die Effizienz der Gesamtreaktion. Die Analyse der Amplifikate erfolgte mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Die erhaltenen Gele konnten photographiert und densitometrisch mittels spezieller Software (semiquantitativ) ausgewertet werden. So konnten Unterschiede in der Expression bestimmter Gene im Verhältnis zum normalisierten β -Actin-mRNA-Gehalt einer jeden Probe bestimmt werden.

3.5.5.1. Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Es wurden je 500ng RNA revers transkribiert. Diese wurden in einem ersten Ansatz mit 1 μ l Oligo(dT) Primer (50 μ M) und PCR-H₂O auf eine Gesamtmenge von 13,5 μ l aufgefüllt.

Zweiter Ansatz: 0,5 μ l RNasin® RNase-Inhibitor 40U/ μ l
 5,0 μ l 2mM dNTP-Mix
 5,0 μ l 5x RT-Puffer
 1,0 μ l M-MLV-Reverse Transkriptase (200U/ μ l)

Der gesamte zweite Ansatz wurde dann in den ersten Ansatz überführt, sodass die Probe ein Gesamtvolumen von 25 μ l aufwies. Der Ansatz wurde anschließend 60min bei 42°C und dann 5min bei 95°C inkubiert.

3.5.5.2. Kontroll-PCR und Elektrophorese der cDNA

Die Reinheit der cDNA wurde mittels Kontroll-PCR und anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Für die Kontroll-PCR wurde folgender Ansatz vorbereitet:

- 1 μ l cDNA
- je ein 1 μ l R- und F-Primer (10 μ M) β -Actin
- 5 μ l 10x PCR-Puffer

- 5µl 2mM dNTP-Mix
- 0,3µl Taq-Polymerase (5U/_l)
- 36,7µl PCR-H₂O

Als erste Negativkontrolle wurde eine Probe vorbereitet, bei der 1µl PCR- H₂O statt 1µl cDNA eingesetzt wurde.

Nach Ablauf des PCR-Programms erfolgte die Vorbereitung der Proben für das Auftragen auf ein 2%iges Agarosegel.

2% Agarosegel: 2g Agarose
10ml 10x TAE-Puffer
ad 100ml Bidest- H₂O

Ansatz: 1µl PCR-Produkt
9µl DNA-Probenpuffer

Für die zweite Negativkontrolle wurde 1µl PCR-Produkt durch 1µl PCR- H₂O ersetzt und dann 9µl DNA-Probenpuffer hinzugefügt. Das Auftragen auf das Agarosegel, die anschließende Elektrophorese und die Färbung mit Ethidiumbromid erfolgte wie unter Punkt 3.5.4. bei der RNA-Kontrollelektrophorese beschrieben.

Bei der Auswertung durfte nur die amplifizierte β-Actin-Bande bei einem Molekulargewicht von 433bp im UV-Licht zu sehen sein. Bei beiden Negativkontrollproben durfte hingegen kein Signal erscheinen.

3.5.5.3. Amplifizierung der cDNA mittels Polymerasekettenreaktion

In der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden aus der mittels reverser Transkription gewonnenen cDNA und mit Hilfe spezifischer Primer verschiedene zu untersuchende Gene und der interne Standard β-Actin coamplifiziert.

Sowohl die Ansätze für die PCR als auch Zyklenanzahl und Annealingtemperatur des PCR-Programmes wurden für die einzelnen zu untersuchenden Gene optimiert.

Tabelle 1: PCR-Bedingungen für die untersuchten Gene

Gen (Faktor)	Ansatz (50_1)	Annealing- temperatur	Zyklen- anzahl
<u>NT-3</u>	-1µl cDNA -4µl R-und F-Primer [10_M] -1µl R-und F-β-Actin-Primer [2_M]	60°C	32
<u>NGF</u>	-1µl cDNA -4µl R-und F-Primer [10_M] -1µl R-und F-β-Actin-Primer [2_M]	60°C	32
<u>BDNF</u>	-1µl cDNA -1,5µl R-und F-Primer[10_M] -0,5µl R-und F-β-Actin- Primer [2_M]	54°C	28
<u>GDNF</u>	-1µl cDNA -1µl R-und F-Primer[10_M] -0,75µl R-und F-β-Actin- Primer [2_M]	54 °C	30
<u>IL-10</u>	-1µl cDNA -1µl R-und F-Primer[10_M] -0,5µl R-und F-β-Actin- Primer [2_M]	58 °C	30
<u>IL-1β</u>	-1µl cDNA -2µl R-und F-Primer [10_M] -0,5µl R-und F-β-Actin- Primer [2_M]	58°C	30
<u>IL-18</u>	-2µl cDNA -2µl R-und F-Primer[10_M] -1µl R-und F-β-Actin-Primer [2_M]	54°C	32
<u>IL-18R</u>	-2µl cDNA -2µl R-und F-Primer [10_M] -1µl R-und F-β-Actin-Primer [2_M]	54°C	32
<u>Fas</u>	-1µl cDNA -1µl R-und F-Primer [10_M] -1µl R-und F-β-Actin-Primer [2_M]	54°C	28

Die Proben bestanden aus 5µl dNTPs, 5_1 10x PCR-Puffer, den Primerverdünnungen, der 0,3_1 Taq-Polymerase, dem jeweiligen Volumen cDNA und wurden mit PCR-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50_1 verdünnt.

Bis auf die unterschiedlich angewandten Annealingtemperaturen und Zyklen war das PCR-Programm für die einzelnen Gene stets gleich.

Tabelle 2: Allgemeiner Ablauf des PCR-Cycler-Programmes

Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit
1	Denaturierung, <i>hot start</i>	94	30sec
2	Denaturierung	94	30sec
3	Annealing	primerspezifisch (s. Tabelle 1)	1min
4	Extension	72	1min
5	x Zyklen d. Schritte 2 bis 4		
6	terminale Extension	72	7min
7	Kühlung	4	∞

Beide Amplifikate sollten gut sichtbare Banden vergleichbarer Intensität auf einem anschließenden Polyacrylamidgel ergeben. Zur Optimierung der erhaltenen Ergebnisse wurde daher, wie oben dokumentiert, das Volumen der eingesetzten Primer, die Zyklenzahl und die Annealingtemperatur für die einzelnen Gene variiert.

3.5.5.4. Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente

Herstellung des 5% Polyacrylamidgels:

50ml 5% PAGE-Lösung
45µl TEMED
100µl 30% APS

Die Gellösung wurde zwischen zwei mit einem Spacer abgedichtete Glasplatten gegossen.

Polyacrylamidgele zeichnen sich gegenüber Agarosegelen durch ein höheres Auflösungsvermögen bei der Auftrennung kleinerer Nukleinsäurefragmente aus.

Vorbereitung der Proben

Es wurden 9µl aus dem jeweiligen PCR-Produkt entnommen und mit 1µl PAGE-Puffer gemischt. Die Proben wurden vor dem Probenauftrag 10min bei 70°C erhitzt und anschließend 5min auf Eis gestellt, um dann 5_1 aufzutragen.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese erfolgte in einem TGGE-Elektrophoresesystem. Für eine gleichmäßige Wärmeleitung wurden 5ml 0,1% Tritonlösung auf die Kühlplatte gegeben. In die Pufferreservoirs wurden gleiche Volumina (je ca. 500ml) Laufpuffer gegeben.

Laufpuffer: 90ml TBE-Puffer
50ml Glycerol
ad 1l Bidest-H₂O

Eine Präelektrophorese wurde für 10min bei 10W durchgeführt.

Nachdem das Gel equilibriert war, konnten die Proben in die Geltaschen aufgetragen werden.

Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurden die Bedingungen der Präelektrophorese übernommen. Die Hauptelektrophorese wurde bei 25W für 120min durchgeführt.

3.5.5.5. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung ist eine sensitive Methode für die Färbung von Nukleinsäuren¹²¹. Ihre Nachweisgrenze liegt bei 0.03ng/mm₂. Die Färbung beruht auf der Veränderung des Redoxpotentials von Silber durch Nukleinsäuren, sodass sich elementares Silber abscheiden kann.

Das Gel wurde in den folgenden Lösungen für die Silberfärbung auf einem Taumel-Wipptisch in folgendem Algorithmus inkubiert:

- 3min in 2% (v/v) Salpetersäure (Lösung)
- Gel dreimal in Bidest-H₂O schwenken
- 20min in 0,2% (w/v) Silbernitratlösung
- Gel dreimal in Bidest-H₂O schwenken
- von der nächsten Lösung 3% (w/v) Natriumcarbonat und 0,02% (v/v) Formaldehyd 37% je 250ml zugeben, Lösung wechseln, wenn diese „schlammig“ erscheint; so lange, bis Banden deutlich sichtbar
- Gel dreimal in Bidest-H₂O schwenken
- 3 min in 1% (v/v) Essigsäure (Lösung)
- Gel dreimal in Bidest-H₂O schwenken
- 4min in Bidest-H₂O
- 5min in 2% (v/v) Glycerol

3.5.5.6. Densitometrische Auswertung der Polyacrylamidgele

Die silbergefärbten Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe des Programms Biometra eingescannt und mit der Biometra-Image-Analysis-Software ausgewertet. Entsprechend der Fläche und Intensität der silbergefärbten Bande wurde ein relativer Volumenanteil berechnet. Dieser Wert kann als ein semiquantitatives Maß genutzt werden.

Grundlage der Methode der semiquantitativen RT-PCR ist die These der gleichmäßigen Expression des internen Standards β -Actin in Zellen aller Entwicklungsstufen. Aufgrund der Sensitivität der PCR kann es zu Schwankungen in der Amplifikation kommen, die von Probe zu Probe verschieden stark sind (so genannte *tube-to-tube variation*). Daraus folgen nicht mehr einheitliche Standardbanden. Zum anderen existieren in biologischen Proben „natürliche“ Expressionsunterschiede von bis zu 15%. Um festzustellen, ob die Expression der Gene der einzelnen Faktoren in den verschiedenen Zeitintervallen nach der Hyperoxie signifikante Unterschiede aufweist, wurde daher eine Korrektur nach folgendem Algorithmus vorgenommen:

1. den relativen Volumenanteil für eine (willkürlich gewählte) β -Actin-Bande 100 % setzen,
2. für alle andern Standardbanden den prozentualen Anteil, bezogen auf die gewählte β -Actin-Bande, berechnen,
3. der für jede Standardbande berechnete prozentuale Anteil gilt auch für die zugehörige Bande des jeweils zu untersuchenden Gens; der relative Volumenanteil dieser Bande wird auf 100% korrigiert.

Der interne Standard wurde demnach als Referenz verwendet, um das mRNA-Niveau des jeweiligen Gens zu normalisieren. Von diesen korrigierten Werten konnten der Mittelwert und die Standardabweichung der Stichprobe bestimmt werden, und eine graphische Aufzeichnung konnte erfolgen. Die mRNA-Gehalte des jeweiligen Gens konnten entweder als Verhältnis des relativen Volumenanteils von β -Actin zum relativen Volumenanteil des Gens angegeben werden. Eine andere Darstellungsweise war die prozentuale Angabe bezogen auf den Mittelwert des internen Standard der 100% entspricht. Änderungen in den Verhältnissen bzw. den prozentualen Anteilen bei verschiedenen Proben waren ein Indiz für die veränderte mRNA-Expression des zu untersuchenden Gens.

3.6. WESTERN BLOT

Während bei der RT-PCR nur die Genexpression der einzelnen Faktoren nachgewiesen wurde, diente die Methode des Western Blot zum direkten Nachweis der Proteine. Dabei wurden die Proteinfractionen zunächst durch Elektrophorese in einem 8% Polyacrylamidgel getrennt. Im Anschluss daran folgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert, sodass dieser spezifisch an das nachzuweisende Protein binden konnte. Um den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex anzufärben, wurde ein zweiter Antikörper verwendet, dessen Antigen wiederum der erste Antikörper darstellte (Anti-Antikörper). Ein an dieses zweite Immunglobulin gekoppeltes Enzym setzte ein farbloses Substrat in einer enzymatischen chemilumineszenten Reaktion in einen Farbstoff um. Auf einem anschließend aufgelegten Röntgenfilm erschien ein dunkler Strich, der selektiv die Lage der nachzuweisenden Proteine anzeigte.

3.6.1. Proteinextraktion

Die Gewebeproben wurden gewogen und der Extraktionspuffer vorbereitet (2ml pro Probe).

Extraktionspuffer (100ml): 100ml Lysepuffer
 100µl Aprotinin (Trypsin-Protease-Inhibitor)
 50µl PMSF (Serin-Protease-Inhibitor)
 50µl Leupeptin (Serin-,Cystein-Protease-Inhibitor, 1mg/ml)
 100µl Pepstatin (Säure-Protease-Inhibitor, 1mg/1ml)

Zur Homogenisierung, die bei 4°C durchgeführt wurde, wurde das gefrorene Gewebe mit 10x (w/v) Extraktionspuffer versetzt.

Anschließend wurden die Proben in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 1050xg zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Zytosol- und Mitochondrial-Proteinfraction und wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und erneut 20min bei 4°C und 17000xg zentrifugiert. Der Überstand, die Zytosolfraction, wurde wiederum in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, das Pellet, die Mitochondrialfraction, mit 200µl Extraktionspuffer resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels eines BCA-Protein-Assays.

Dabei wurde BSA als Proteinstandard verwendet. Alle Proben wurden dreifach bestimmt. Die Konzentrationsreihe für BSA war: 2,0mg/ml; 1,0mg/ml; 0,5mg/ml; 0,2mg/ml und 0,02mg/ml. Zur Verdünnung wurde PBS verwendet. Auch die Proben wurden mit PBS verdünnt, die Zytosolfraktion 1:5 und die Mitochondrialfraktion 2:5. Für die Reagenzlösung wurden 50 Teile vom BCA-Reagenz A (Puffer mit Bicinchoninsäure) mit 1 Teil von BCA-Reagenz B (Lösung mit 4% Kupfersulfat) gemischt und zu den Proben gegeben. Ihre Absorption wurde bei 562nm in einem Mikroplattenreader bestimmt. Aus den erhaltenen Daten wurde eine Standardkurve erstellt, an der die Proteinkonzentrationen der Proben ($\mu\text{g/ml}$) kalkuliert werden konnten.

3.6.3. Gelelektrophorese

Das 8%ige Trenngel wurde zwischen die Glasscheiben bis 2cm unterhalb des Kammeinsatzes gegossen und mit Isopropanol überschichtet.

Trenngel (8%): 5ml 4x Trenngelpuffer (pH 8,8)
5,75ml destilliertes Wasser
4ml 40% Acrylamid
50 μl TEMED (Polymerisationsagens)
200 μl APS (12,5%, Polymerisationskatalysator)

Nach 20min war das Gel auspolymerisiert, und das Isopropanol wurde abgegossen. Anschließend wurde das 4,4% Sammelgel gegossen und sofort der Probeauftragskamm eingesetzt.

Sammelgel (4,5%): 2,5ml 4x Sammelgelpuffer (pH 6,8)
3,7ml destilliertes Wasser
1ml 40% Acrylamid
30 μl TEMED
80 μl APS (12,5%)

Je nach nachzuweisendem Protein wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen aufgetragen, für Fas: 50 μg , für MAPK: 25 μg und für Akt: 25 μg . Zu 9 μl Probevolumen wurden je 9 μl Laemmli-Puffer hinzugegeben. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein Rainbow-Marker verwendet. Dazu wurden 3 μl Rainbow-Marker-Lösung mit 6 μl PCR- H_2O und 9 μl Laemmli-Puffer gemischt. Proben und Marker wurden dann bei 95°C für 5min inkubiert und bis zum Probenauftrag 5min auf Eis gestellt.

Das Pufferreservoir der Elektrophoresekammer wurde mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt.

1x Elektrophoresepuffer: 50ml 10x Elektrophoresepuffer
450ml destilliertes Wasser

Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurden Proben und Marker aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Zunächst für 30min bei 100V, bis das Bromphenolblau des Laemmli-Puffers das Trenngel erreichte, und dann für 90min bei 160V, bis die blaue Farbstofffront sich ca. 1–2cm oberhalb des Gelendes befand.

3.6.4. Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Tankblot-Verfahren)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel vorsichtig in eine Pufferbox mit Transferpuffer für 20min überführt und unter leichtem Schütteln gewaschen.

Transferpuffer: 5,3g Tris (0,04M)
25,3g Glycin (0,306M)
220ml 100% Ethanol (20% v/v)
1,1ml 10% SDS (0,01%)

auf 1,1 Liter mit destilliertem Wasser auffüllen

Der Aufbau des „Blottingsandwichs“ für ein Gel war folgender:

- Schwamm
- zwei Chromatographiepapiere (3MM Whatman)
- Gel
- Nitrocellulosemembran (kurz in Transferpuffer getränkt)
- zwei Chromatographiepapiere
- Schwamm

Die Blot-Apparatur wurde mit Transferpuffer gefüllt und das Blottingsandwich eingesetzt. Der Transfer wurde dann für 90min bei 150mA vollzogen.

Anschließend wurde die Membran kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mit Ponceau-Rot für ein paar Minuten zur Kontrolle der Transferqualität gefärbt, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Zum Entfärben wurde die Membran kurz mit destilliertem Wasser und danach für ca.5min mit TBS-Tween-20-Puffer (0,1%) gewaschen.

3.6.5. Blockierung

Um freie Bindungen auf der Membran zu blockieren, wurde diese für 2std mit 5%iger Magermilchlösung inkubiert. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 4x für 10min in TBS-Tween-20-Puffer (0,1%) gewaschen.

1. Antikörper

Der Antikörper wurde 1:1000 verdünnt. Dazu wurden 2µl Antikörper mit 2ml TBS-Tween-20-Puffer (0,1%) und 20mg BSA vermengt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in einer speziellen Inkubationsbox. Diese wurde auf einem Schüttler fixiert und unter leichtem Schütteln bei 4°C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde die Membran 3x für 15min mit TBS-Tween-20-Puffer (0,1%) gewaschen.

2. Antikörper

Auch der zweite Antikörper wurde nach der oben beschriebenen Methode 1:1000 verdünnt. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln in der Inkubationsbox für 1std bei RT. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran wiederum 3x für 15min mit TBS-Tween 20 Puffer (0,1%) gewaschen.

3.6.6. Röntgenfilmentwicklung

Zum enzymatischen Nachweis der erfolgten Antikörperreaktion wurde die ECL-Detektlösung im Verhältnis 1:1 gemischt. 3ml ECL-Lösung I (Luminol, p-Coumarsäure, Tris-HCL pH 8,5) und 3ml ECL-Lösung II (Tris-HCL pH 8,5). Dazu wurde zunächst noch die ECL-Lösung II mit 1,8µl 30%iger Wasserstoffperoxidlösung versehen. Dieses ECL-Gemisch wurde dann für eine Minute im Dunkeln auf die Membran in einer Plastikinkubationsbox gegeben und für eine Minute geschwenkt. Dabei reagierte das Peroxidaseenzym mit dem Wasserstoffperoxid, wodurch es zu einer Änderung der Ringkonformation des Luminols und letztlich zur Lichtemission kam. Ein Hyperfilm-ECL-Röntgenfilm wurde auf die Membran gelegt und die Filmkassette verschlossen. Je nach nachzuweisendem Protein, Antikörper und Qualität des Western Blot wurde der Film 0,5–15min exponiert und dann in einer Filmentwicklungsmaschine entwickelt. Die entwickelten Filme wurden von einem Flachbrettscanner eingescannt und mit der TINA 2.09g-Software ausgewertet.

3.6.7. Entfernen gebundener Antikörper („Stripping“)

Um eine Membran nochmals zu verwenden, bestand die Möglichkeit, die gebundenen Antikörper abzuwaschen („zu stripping“) und mit neuem Antikörper zu hybridisieren. Dazu wurde die Membran zunächst 2x für 10min mit TBS-Tween-20-Puffer (0,1%) gewaschen und danach im Stripping-Puffer bei RT für 30min inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x für 10min in TBS-Tween-20-Puffer gewaschen und für 2std mit 5% Magermilchlösung bei RT

blockiert. Nach dreimaligem Waschen für 10min in TBS-Tween 20 konnte nun die erneute Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper, wie unter Punkt 3.6.5. beschrieben, erfolgen.

3.7. HISTOLOGISCHE VERFAHREN

3.7.1. DeOlmos Kupfersilberfärbung

In der DeOlmos Kupfersilberfärbung werden degenerierte Axone und Neurone dunkelbraun bis schwarz gefärbt und heben sich deutlich vom goldgelben Hintergrund ab¹²². Die Färbung beruht auf einer Reaktion des Axoplasmas von degenerierten Neuronen mit dem Silbersalz, das durch die durchlässig gewordene Zellmembran der geschädigten Neurone in die Zellen eindringen kann. Die DeOlmos Kupfersilberfärbung sagt nichts über den Pathomechanismus aus, der zu der neuronalen Degeneration geführt hat, sie zeigt nur, dass Zellen zugrunde gegangen sind.

Für die Aufarbeitung der nachfixierten Gehirne mittels Rotationsvibrator, zum Bereitstellen der Schnitte für die DeOlmos Kupfersilberfärbung, wurden diese über Nacht bei 4°C in 1x PBS belassen und maximal 5 Tage bei 4°C in dieser Lösung, unter täglichem Lösungswechsel, gelagert. Anschließend wurden die Gehirne in 4% Agar eingebettet und am Rotationsvibrator koronar in 70_μm dünne Scheiben geschnitten.

Zur folgenden Kupfersilberfärbung wurde jeder siebte Schnitt ausgewählt und nochmals in Fixierungslösung II für vier Tage nachfixiert. Danach wurden die Schnitte im Dunkeln 1std bei 40°C und anschließend 48 bis 72std bei RT in einer Kupfer-Silber-Lösung inkubiert. Nach der Reinigung mit reinem Aceton erfolgte die 35minütige Inkubation mit Silberdiaminlösung. Unter Agitation wurden die Schnitte exakt 1min in der Reduktionslösung belassen. Dann wurden sie einzeln mit 0,3%iger Kaliumferrizyanidlösung gebleicht. Zweimaliges Waschen mit Bidest-H₂O war die Vorbereitung zur abschließenden Stabilisierung des Färbeergebnisses über eine Minute mit 0,1%iger Natriumthiosulfatlösung. Nach Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate mit Hilfe von Permount auf Objektträger aufgebracht und mit Deckgläsern versehen.

3.7.2. Morphometrie

Das infantile Rattengehirn zeigt im Rahmen der physiologischen Entwicklung Apoptose, darum ist die genaue Quantifizierung des Ausmaßes der Apoptose der Hyperoxie exponierten und der in normaler Raumluft gehaltenen Tiere notwendig.

Für die Untersuchung wurde die stereologische Dissektionsmethode verwendet (*unbiased stereological dissector method*)¹²³. Darunter ist die Aufspaltung des großen, „unzählbaren“ Gewebeblockes in kleine, „zählbare“ Untereinheiten zu verstehen. Diese Fragmente werden nach zufälliger Auswahl mit Hilfe eines fixen Zählrahmens ausgezählt. Dieser Zählrahmen gibt die Ausdehnung in einer Ebene vor, und die dritte Dimension, die zur Beurteilung eines dreidimensionalen Objekts notwendig ist, wird durch die Dicke des Schnittes bestimmt. Das Ergebnis dieser ausgezählten Untereinheiten wird mit der Gesamtzahl aller Untereinheiten multipliziert. Als mögliche Fehlerquellen kommen in Betracht: extrem inhomogene Verteilung der zu zählenden Objekte und Schwellung oder Schrumpfung des Gesamtvolumens. In diesem Fall wurde ein 0,05 x 0,05mm großer Zählrahmen verwendet.

Die Höhe des Schnittes betrug 0,07mm. Es wurden zufällig acht bis zehn Felder innerhalb einer Hirnregion ausgesucht und ausgezählt.

Die zugrunde liegenden Zahlen für normale Zelldichten wurden mit Hilfe von nach Nissen gefärbten Schnitten (Methylenblau, Azur B) ermittelt. Das Ausmaß der Apoptose wird als Verhältnis der Anzahl degenerierter Zellen zur Gesamtzahl dargestellt und durch einen Prozentwert ausgedrückt (Mittelwert +/- Standardfehler, SEM). Die Dichte an degenerierten Zellen wurde zum einen für die einzelnen Regionen ausgewiesen, und in einem zweiten Schritt wurden die einzelnen Zelldichtewerte zu einem Gesamtscore summiert. So konnten Tiere aus Kontroll- und Versuchsgruppe anhand eines einzelnen Wertes verglichen werden. Im Einzelnen wurden 12 Hirnregionen ausgezählt:

- frontaler Kortex
- parietaler Kortex
- Gyrus cinguli
- retrosplenialer Kortex
- Nucleus caudatus (mediodorsaler Teil)
- Corpus callosum und angrenzende weiße Substanz
- lateraldorsaler, mediodorsaler und ventraler Thalamus
- Subiculum
- Hypothalamus

- Hippocampus (Gyrus dentatus)
- Nucleus accumbens

3.7.3. Statistische Auswertung

Die Auszählung der mit DeOlmos Kupfersilberfärbung gefärbten Präparate erfolgte blind und wurde durch erfahrene Untersucher kontrolliert. Das Endresultat wurde als numerische Neuronendichte angegeben: degenerierte Neurone pro Kubikmillimeter. Es wurden insgesamt 12 Hirnregionen ausgewertet. Die Ergebnisse jeder Region wurden gemittelt. Die Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des Student's t-Test auf ihre Signifikanz hin geprüft. Die Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der durch Hyperoxie bedingten Schäden wurden mit Hilfe der ermittelten Gesamtscores und der Varianzanalyse (ANOVA) überprüft.

3.7.4. TUNEL-Färbung

Ein Kennzeichen der Apoptose ist die Aufspaltung der nukleären DNA durch Endonukleasen in Fragmente von ca. 180 Basenpaaren Länge. Die TUNEL-Färbung weist diese DNA-Fragmente nach¹²⁴. Das Enzym Terminaldesoxynukleotidyltransferase reagiert nur mit 3'-OH-Enden von DNA und fügt an sie biotinylierte Polydesoxyuridylnukleotide an. Diese Biotinenden reagieren nun ihrerseits mit Avidin, das an eine Peroxidase gekoppelt ist. Diese Peroxidase katalysiert die Farbreaktion, die im histologischen Präparat sichtbar wird. Eine apoptotische Zelle ist mit der TUNEL-Methode für ca. 1–3std nachweisbar.

Nach definierten Zeiträumen in Hyperoxie wurden die sieben Tage alten Ratten, wie unter Punkt 3.4.2. beschrieben, getötet und perfundiert. Die Gehirne wurden am Vibratom in 70_μm dünne Scheiben geschnitten. Die Färbung wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits (ApopTag® *In Situ* Apoptosis Detection Kit) durchgeführt, und die Gehirne wurden mit Methylgrün gegengefärbt. Das Resultat waren dunkelbraune Kerne von allen Zellen, die DNA-Fragmentierung zeigten. Das Zytoplasma intakter Zellen wurde mit Methylgrün angefärbt.

3.7.5. Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3

Die Gehirne wurden in Paraffin eingelegt und koronar am Mikrotom in 5_μm dicke Scheiben geschnitten. Danach wurden sie auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden anschließend in Zitratpuffer (pH = 6,0) bei 750 W in der Mikrowelle inkubiert¹²⁵. Die endogene Peroxydaseaktivität wurde mit 0,6% (v/v) Hydrogenperoxid (15min) blockiert. Danach wurden die Schnitte zunächst 20min mit normalen

Ziegenserum und anschließend über Nacht bei 4°C mit einem 1:100 verdünnten Caspase-3 Antikörper inkubiert. Die Negativkontrollen wurden mit Hilfe von Peptidimmunogen durchgeführt, einem Konkurrenten der Antikörperbindung. Die Schnitte wurden anschließend mit Ziegen-Antikaninchen-IgG versehen. Nach der Färbung mit einem ABC Kit konnten die positiven Zellen mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB) visualisiert und mit Mayers Hämalaun gegengefärbt werden.

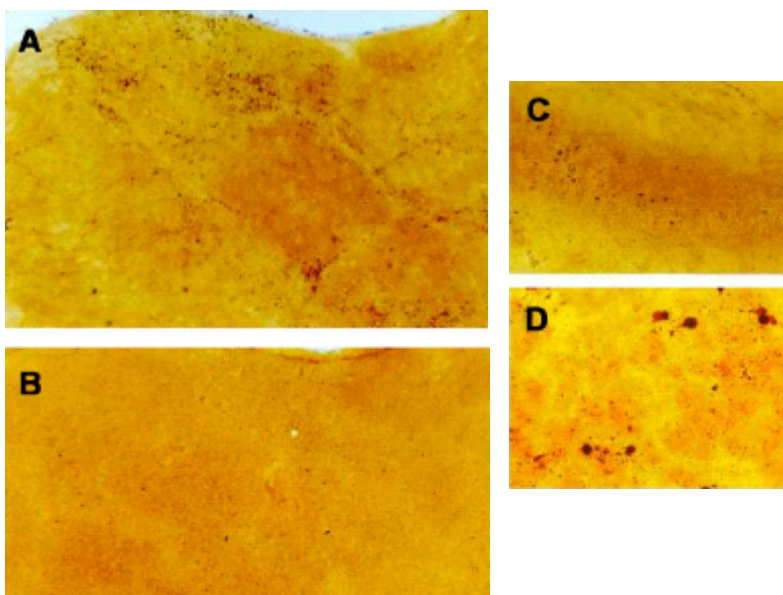
4. ERGEBNISSE

4.1. PHYSIOLOGISCHE PARAMETER

Es gab keine Beeinträchtigungen oder Unterschiede in Körpergewicht und Atmung der Tiere in 80%igem Sauerstoff verglichen mit den Kontrolltieren. Bei allen Tieren wurden keine klinischen Beeinträchtigungen festgestellt, und es gab keine Mortalität.

4.2. HISTOLOGISCHER NACHWEIS DER APOPTOSE

Um festzustellen, ob Sauerstoffkonzentrationen zu Schädigungen im sich entwickelnden Gehirn führen, wurden 6 Tage alte Ratten mit ihren Müttern einer 80%igen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt, sofort getötet und transkardial perfundiert. Die histologische Auswertung mit Hilfe der DeOlmos Kupfersilberfärbung oder TUNEL-Färbung zeigt eine vermehrte Dichte der degenerierten Zellen in verschiedenen Hirnregionen im Vergleich zu den nicht exponierten Tieren.



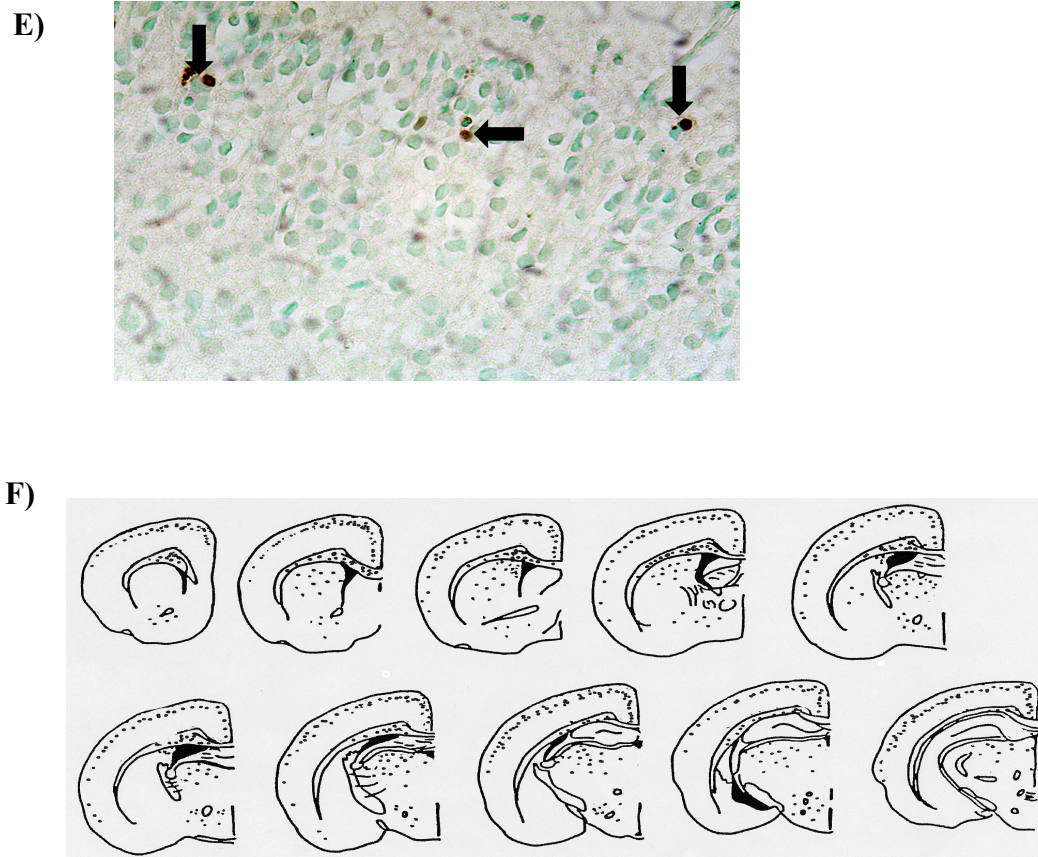


Abbildung 6: Darstellung morphologischer Veränderungen bei Hyperoxie-induzierter Neurodegeneration. **A–D)** Nach DeOlmos gefärbte histologische Schnitte vom Thalamus (A und B), Subiculum (C) und Corpus callosum (D), von Hyperoxie-exponierten Ratten (A, C und D) und Kontrolltieren (B). Degenerierte Zellen finden sich reichlich in den hyperoxischen Gehirnen (A, C und D) und nur vereinzelt in den Gehirnen der Ratten in normaler Umgebungsluft (B). **E)** Detailaufnahme eines mit TUNEL gefärbten mikroskopischen Schnitts des Kortex (RSC) eines 7 Tage alten Rattengehirns mit Darstellung apoptotischer Zellen. **F)** Eine schematische Darstellung der Verteilung des Hyperoxie-induzierten Zelltodes im 7 Tage alten Rattengehirn nach 12std Hyperoxie mit 80% O₂. Vergrößerungen: A und B x25; C x40; D und E x120.

Um die Dauer der O₂-Exposition zu bestimmen, die notwendig ist, um Apoptose im sich entwickelnden Gehirn auszulösen, wurden die 7 Tage alte Ratten für 2, 6, 12, 24, 48 oder 72std 80%igem Sauerstoff ausgesetzt. Die Analyse der Silberfärbungen der Rattengehirne ergab, dass es nach 6std Hyperoxieexposition zu einem leichten und nach 12std zu einem signifikanten Anstieg des apoptotischen Zelltodes kam. Ein maximales Vorkommen von apoptotischer Neurodegeneration konnte nach 24std Hyperoxie beobachtet werden. Nach längerer Expositionsdauer (48 und 72std) wurde keine weitere Steigerung mehr beobachtet (s. Abb.7).

Hyperoxie-induzierte Apoptose

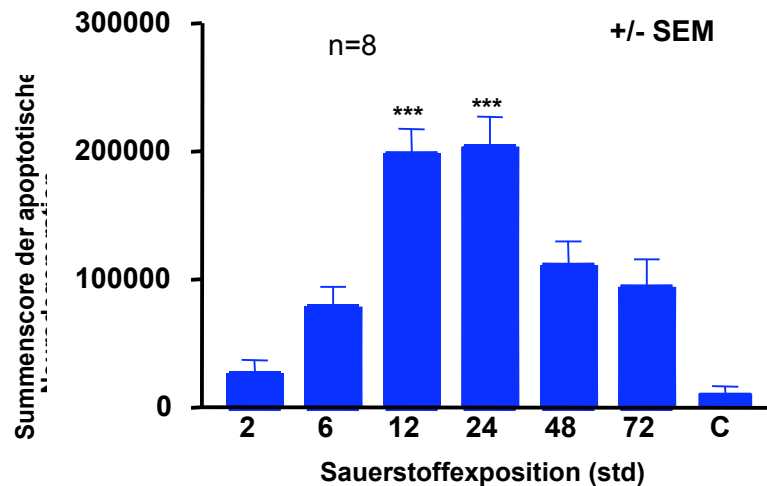


Abbildung 7: Zeitverlauf des Hyperoxie-induzierten Zelltodes im Gehirn von 7 Tage alten Ratten. Die Dichte der degenerierten Zellen (nach DeOlmos gefärbt) wurde mit der stereologischen optischen Dissektionsmethode in 12 Hirnregionen bestimmt. Diese Zelldichtewerte wurden zu einem Gesamtwert für jedes Gehirn addiert (Score).

4.3. DER EINFLUSS VON HYPEROXIE AUF DIE EXPRESSION DER WACHSTUMSFAKTOREN

Um mögliche Mechanismen zu untersuchen, die in die Pathogenese der apoptotischen Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn, ausgelöst durch Hyperoxie, involviert sind, wurde getestet, ob und wie Hyperoxie die Expression von BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*), NT-3 (*neurotrophin 3*) und GDNF (*glia-derived neurotrophic factor*) im retrosplenialen Kortex, Striatum und Thalamus beeinflusst. Aus diesem Grund wurden 7 Tage alte Ratten 80% O₂ für 2, 6, 12 oder 24std (n = 6 pro Gruppe) ausgesetzt und sofort nach dem Ende der Exposition getötet. Hyperoxie triggert eine verminderte Expression aller vier Wachstumsfaktoren in den untersuchten Hirnregionen Thalamus (THA), Striatum (STR) und retrosplenialer Kortex (RSC) auf mRNA-Ebene, mit einem Maximum der Herabregulation zwischen 2–6std. (s. Abb.8a–8d).

Mittels Western-Blot-Verfahren konnte festgestellt werden, dass die Herabregulation von BDNF, NGF, NT-3 und GDNF auf mRNA-Ebene assoziiert ist mit einer Runterregulierung der aktivierten, phosphorylierten Isoformen der Serin-Threonin-Kinase Akt (p-Akt, Proteinkinase B)

und ERK1/2 (p-ERK 1/2) (*extracellular signal-regulated protein kinase*), einem Mitglied der MAPK-Familie, Mediatoren der intrazellulären Signale, die der Aktivierung der Tyrosinrezeptorkinase (Trk) durch Wachstumsfaktoren folgen. Es zeigte sich, dass es nach 12std zu einem maximalen Abfall der Proteinexpression in den untersuchten Gehirnen der 7 Tage alten Ratten kam (s. Abb.9).

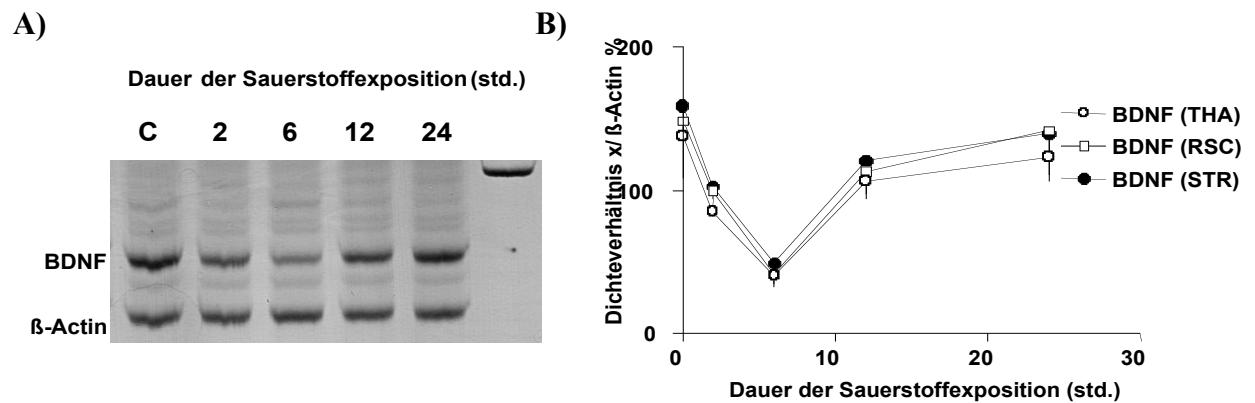


Abbildung 8a: Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von BDNF

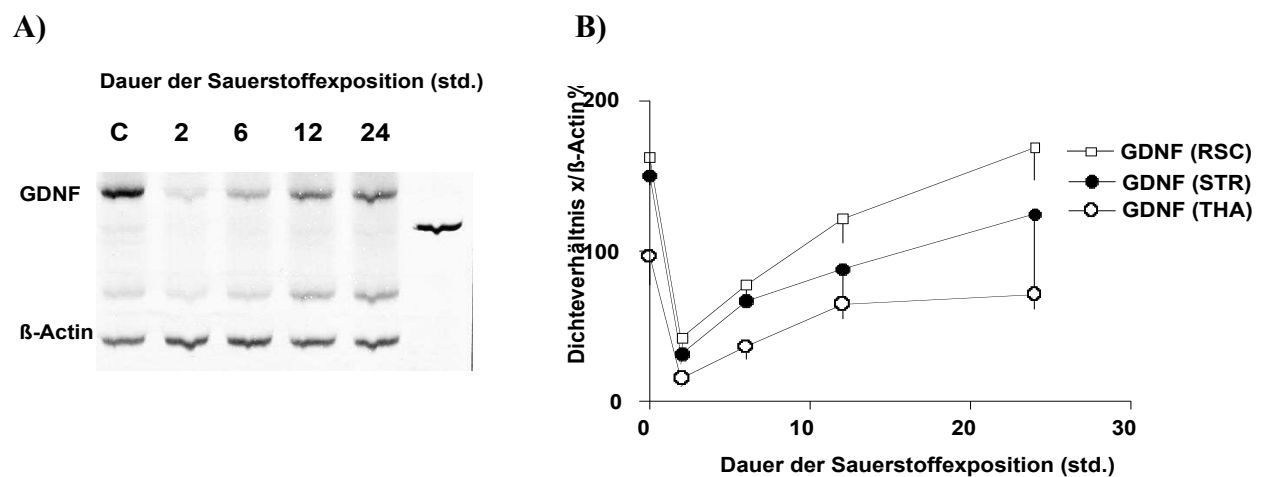


Abbildung 8b: Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von GDNF

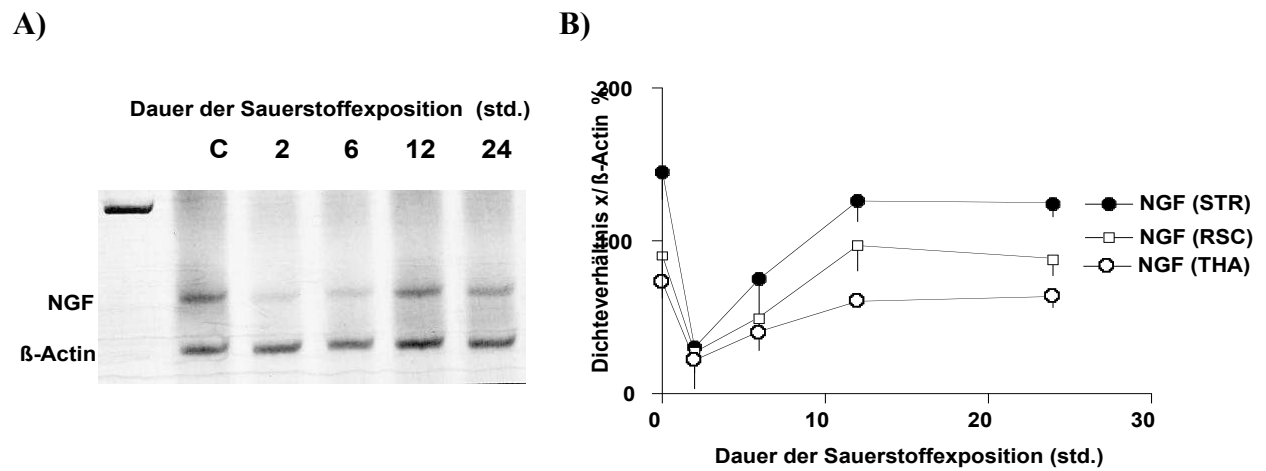


Abbildung 8c: Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von NGF

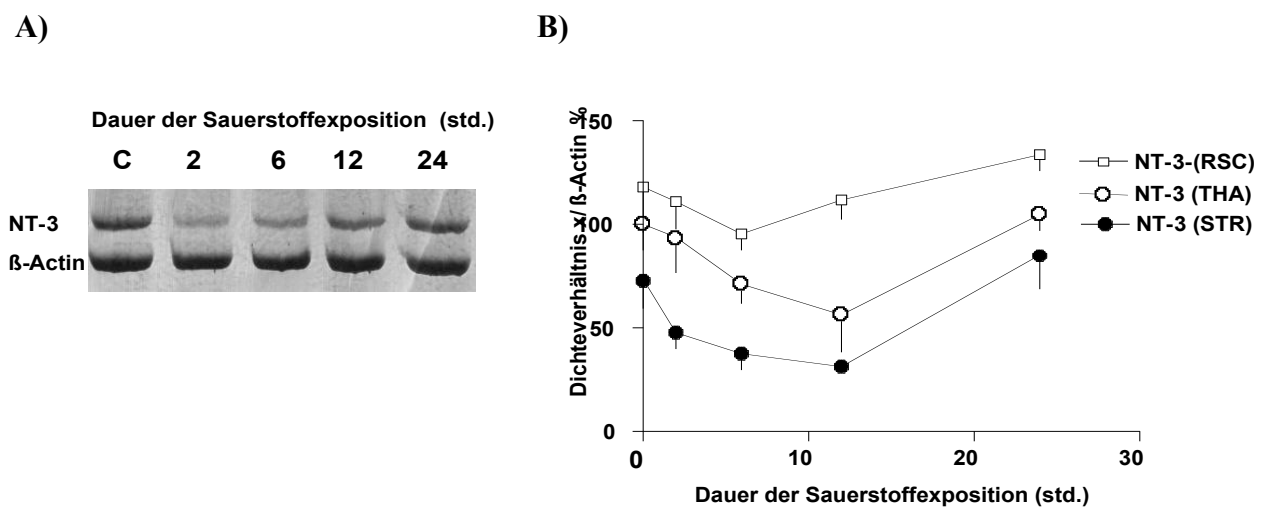


Abbildung 8d: Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von NT-3

Abbildung 8a–d: Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von Neurotrophinen.

A) Die Polyacrylamidgele zeigen eine Herabregulation der mRNA-Expressionen der Wachstumsfaktoren nach Hyperoxie im Gehirn von 7 Tage alten Ratten. Hier dargestellt ist jeweils der rechte Thalamus. **B)** Es wurden die mRNA-Expressionen der Wachstumsfaktoren a) BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), b) GDNF (*glia-derived neurotrophic factor*), c) NGF (*nerve growth factor*) und d) NT-3 (*neurotrophin 3*) im retrosplenialen Kortex (RSC), Thalamus (THA) und Striatum (STR) in den rechten Hirnhemisphären von Kontrolltieren (C) und von Ratten nach 2, 6, 12 und 24std Hyperoxie (80% O₂) mit Hilfe der RT-PCR bestimmt. Das Dichteverhältnis dieser Wachstumsfaktoren wurde in Relation zum internen Standard β -Actin bestimmt (n = 6 pro Kontrolle und Zeiteinheit).

Bei BDNF kam es nach 6std, bei NGF und GDNF nach 2std in Hyperoxie zu einem maximalen Abfall der mRNA-Expressionen. Der maximale Abfall der NT-3-mRNA-Expression lag zwischen 6 und 12std.

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Wachstumsfaktoren kam es nach 24std O₂-Exposition zu einem Anstieg der mRNA-Level auf die Ausgangswerte.

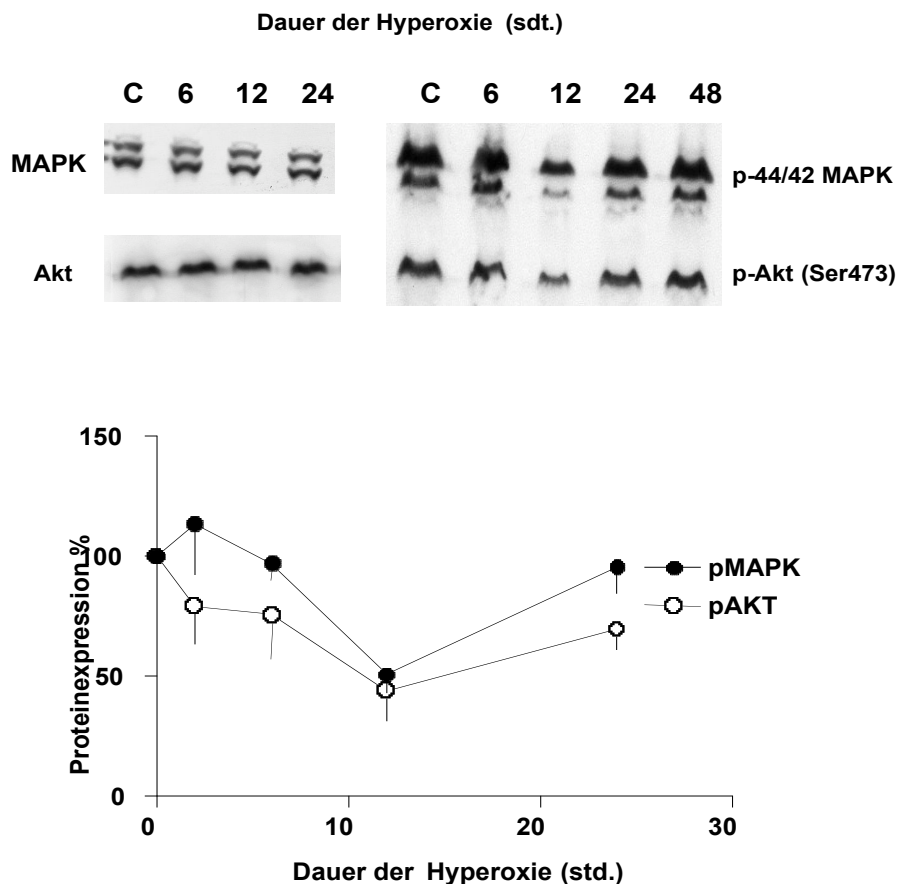


Abbildung 9: Die Western Blots zeigen eine Herabregulation von p-MAPK und p-AKT nach Hyperoxie im rechten Thalamus von 7 Tage alten Ratten. Das MAPK-, p-MAPK-, Akt- und p-Akt-Protein wurde im rechten Thalamus von Kontrolltieren (C) und den der Hyperoxie ausgesetzten Tieren untersucht (n = 6 pro Zeiteinheit). Die Proteinexpression wurde berechnet in bezug auf das jeweilige Protein in den Kontrolltieren. Die Ratten wurden 6, 12, 24 oder 48std einer Hyperoxie (80% O₂) ausgesetzt.

Nach 12std Hyperoxie zeigte sich eine maximale Runterregulierung der untersuchten Proteinexpression von p-Akt und p-MAPK, während es bei den unaktivierten, unphosphorylierten Isoformen von MAPK und Akt zu keinen Veränderungen der Proteinexpressionen kam.

4.4. REGULATION DER FAS- UND ZYTOKINEXPRESSION UND DER CASPASE-3-AKTIVITÄT UNTER HYPEROXIE

4.4.1. Hochregulierung des Todesrezeptors Fas durch Hyperoxie

Um herauszufinden, ob es durch Hyperoxie zu einer Aktivierung des extrinsischen Weges der Apoptose über Fas kommt, wurde der Zusammenhang zwischen Hyperoxie und Fas-Expression im Gehirn 7 Tage alter Ratten mit Hilfe von RT-PCR und Western-Blot-Verfahren untersucht. Dafür wurden 6 Tage alte Ratten für 6, 12, 24 und 48std (n = 6 pro Zeiteinheit) einer Hyperoxie (80% O₂) ausgesetzt und nach dem Ende der Sauerstoffexposition sofort getötet. Im Vergleich dazu wurden Kontrolltiere (n = 4) in normaler Raumluft gelassen. Mit Hilfe der densitometrischen Analyse wurden die Polyacrylamidgele ausgewertet und das Dichteverhältnis (Fas in Bezug auf β -Actin) statistisch bestimmt. Sauerstoffexposition triggert eine vermehrte mRNA-Expression von Fas in Kortex, Thalamus und Striatum mit einem signifikanten Anstieg nach 6std und einem Maximum nach 12std Hyperoxie (s. Abb.10A/B).

Die Proteinexpression von Fas wurde mittels Western-Blot-Verfahren in Thalamus, Striatum und Kortex bestimmt. Die sechs Tage alten Ratten wurden nach 6, 12, 24 und 48std (n = 6 pro Zeiteinheit) Sauerstoffexposition getötet. Erhöhte Proteinlevel von Fas wurden im ipsilateralen Thalamus nach 6std Hyperoxie gefunden, mit dem größten Anstieg nach 12 und 24std O₂-Exposition (s. Abb.10B). Ähnliche Ergebnisse konnten in Proteinanalysen mit Proben aus Striatum und Thalamus festgestellt werden.

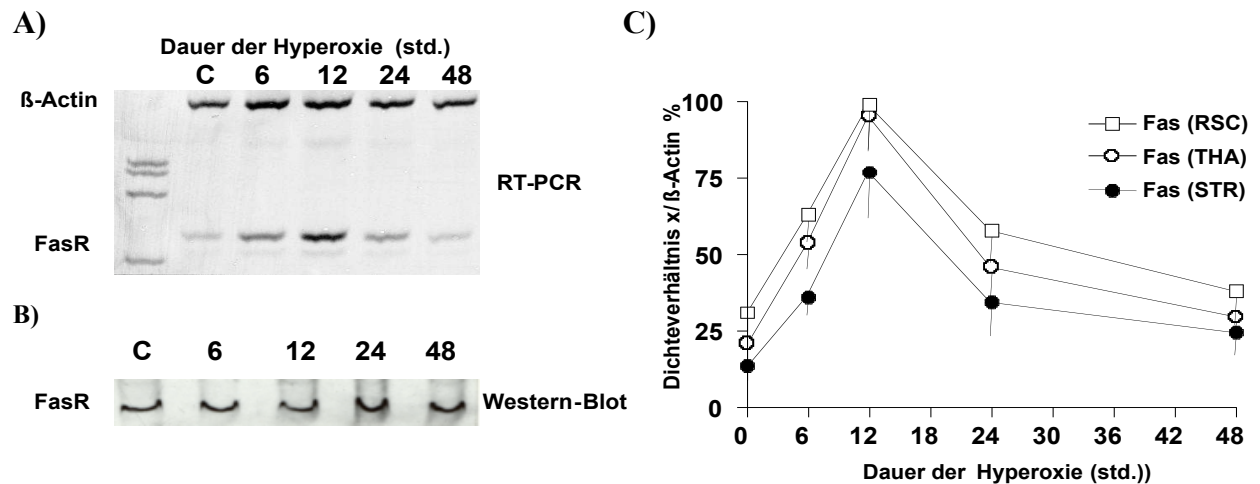


Abbildung 10A–C: Das Polyacrylamidgel (A) der RT-PCR zeigt eine Hochregulierung von Fas auf mRNA-Ebene mit einem Maximum nach 12std in Hyperoxie (80% O₂) im rechten Thalamus. Das Dichtebeziehungsdiagramm wurde in Relation zum internen Standard β -Actin ermittelt (C) und im Thalamus (THA), Striatum (STR) und retrosplenialen Kortex (RSC) bei Kontrolltieren (C) und bei Ratten, die für 6, 12, 24 oder 48std (n = 6 pro Zeiteinheit) einer Hyperoxie ausgesetzt waren, bestimmt.

Der Western Blot (B) zeigt, dass es auf Proteinebene zu einer Hochregulierung des Fas-Rezeptors mit einem Maximum bei 24std in Hyperoxie kam. Das Fas-Protein wurde im rechten Thalamus der Kontrolltiere und der Tiere in Hyperoxie (n = 6 pro Zeiteinheit) bestimmt. Dabei wurde die Proteinexpression nach Hyperoxie in Relation zu den Kontrolltieren gemessen.

4.4.2. Sauerstoffexposition triggert die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss Hyperoxie auf die Expression von inflammatorischen Zytokinen im sich entwickelnden Gehirn hat, wurden 6 Tage alte Ratten 2, 6, 12, und 24std (n = 6 pro Zeiteinheit) 80%iger Sauerstoffkonzentration ausgesetzt. Mit Hilfe der RT-PCR wurde dann die mRNA-Expression von IL-1 β und IL-18 im rechten Thalamus, Striatum und retrosplenialen Kortex bestimmt.

Sauerstoff triggert einen Anstieg der mRNA von IL-1 β und IL-18 in den untersuchten Geweben des sich entwickelnden Rattengehirns. Dieser Effekt wurde nach 2std Hyperoxie offensichtlich. Nach 6std wurde ein Maximum der mRNA-Level erreicht, und nach 12–24std kam es zu einem Abfall auf die Basalwerte (s. Abb.11 und 12).

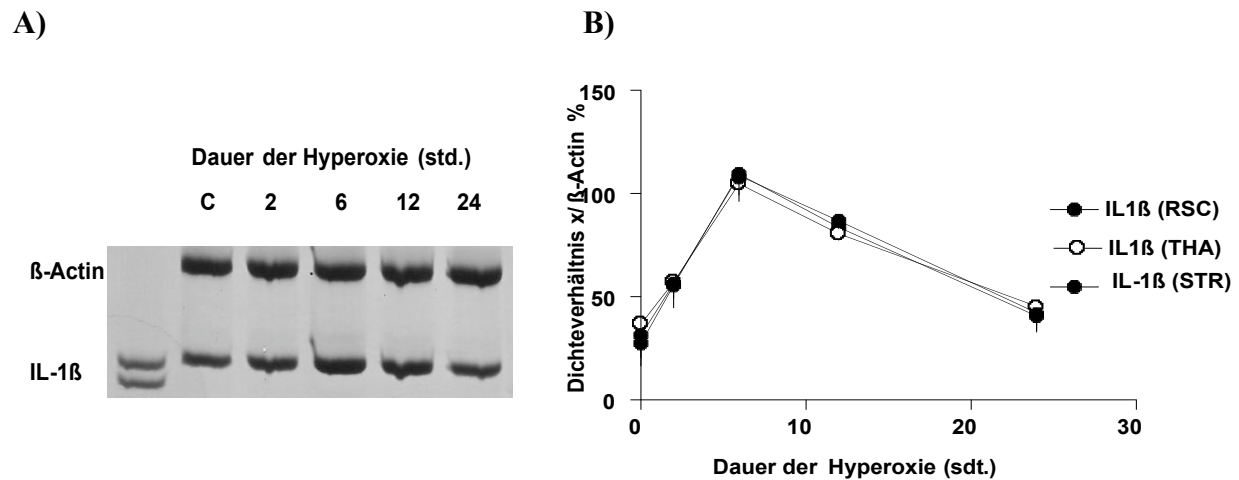


Abbildung 11: Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von IL-1 β

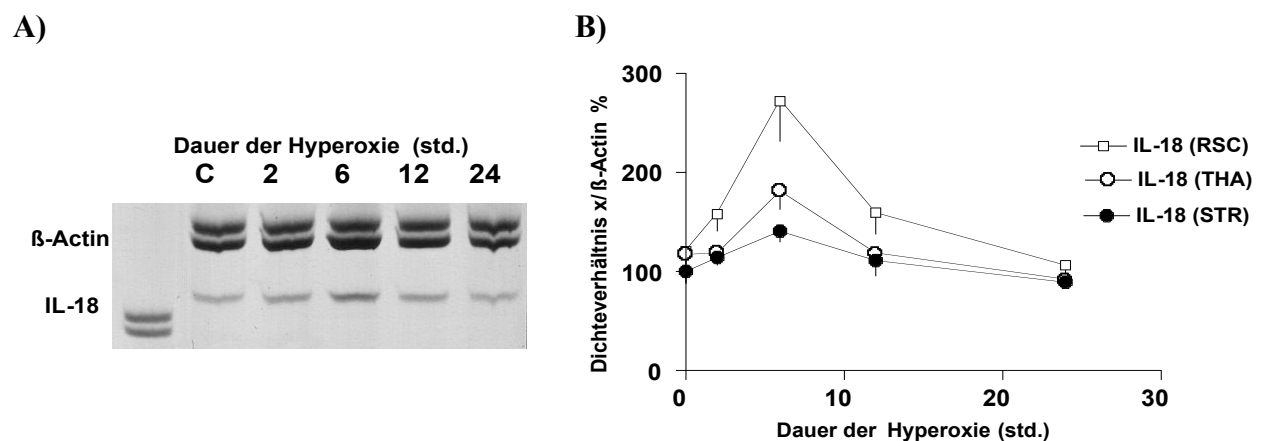


Abbildung 12: Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von IL-18.

Abbildungen 11–12: **A)** Die Polyacrylamidgele zeigen die Hochregulation der mRNA der Zytokine IL-1 β und IL-18 im rechten Thalamus 7 Tage alter Ratten nach Hyperoxie. **B)** Es wurde die m-RNA Expression dieser inflammatorischen Interleukine in Thalamus (THA), Striatum (STR) und retrosplenialen Kortex (RSC) der rechten Hirnhemisphären von Kontrolltieren (C) und 7 Tage alten Ratten nach 2, 6, 12 und 24std Hyperoxie (80% O₂) mit Hilfe der RT-PCR bestimmt. Das Dichteverhältnis wurde in Relation zum internen Standard β -Actin bestimmt. Zu einem maximalen Anstieg der mRNA-Expression von IL-1 β und IL-18 kam es nach 6std Sauerstoffexposition.

4.4.3. Sauerstoffexposition triggert die Transkription des IL-18-Rezeptors (IL-18R)

Um die Transkription des IL-18-Rezeptors unter den pathologischen Konditionen einer Hyperoxie (80%ige Sauerstoffkonzentration) zu untersuchen, wurden die mRNA-Level in Thalamus, Striatum und retrosplenialen Kortex von Ratten nach Sauerstoffexposition und Kontrollratten analysiert. Die Zeiteinheiten der Hyperoxie (n = 6 pro Zeiteinheit und Kontrolle) waren wie bei IL-18 2, 6, 12 und 24std.

Es gab einen signifikanten Anstieg der IL-18R-mRNA in allen drei untersuchten Hirnregionen nach 2std O₂-Exposition. Das Maximum der Hochregulation lag bei 6std und nach 24std kam es zu einem Abfall der mRNA-Expression auf die Ausgangswerte.

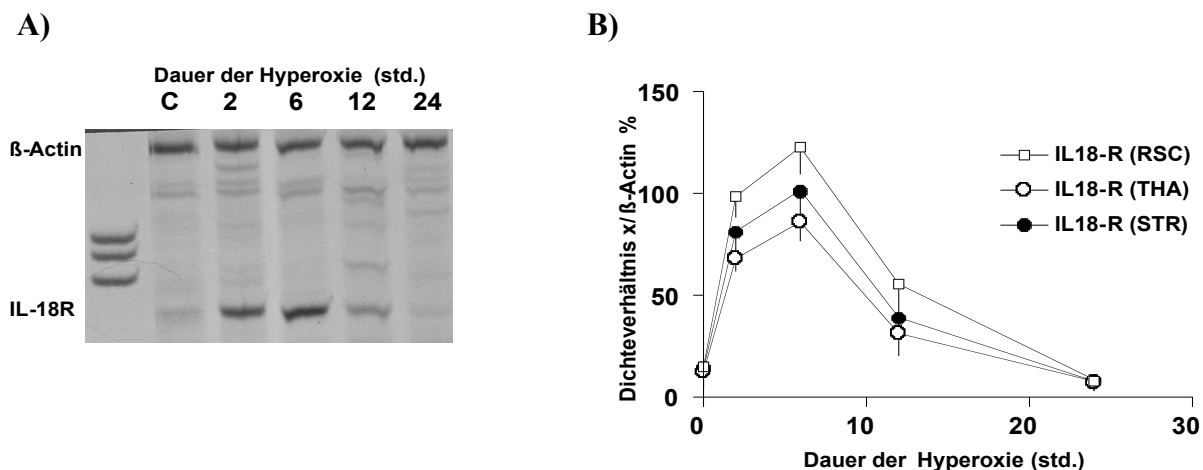


Abbildung 13: Einfluss von Hyperoxie auf die Expression des IL-18-Rezeptors (IL-18R).

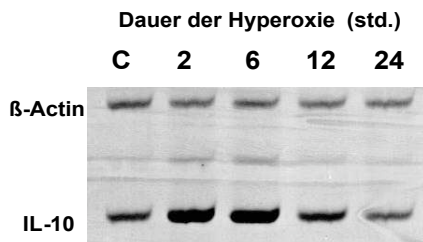
A) Das Polyacrylamidgel zeigt eine Hochregulation auf mRNA-Ebene des Interleukin-18-Rezeptors im rechten Thalamus 7 Tage alter Ratten. **B)** Es wurde die mRNA-Expression des IL-18-Rezeptors (IL-18R) in Thalamus (THA), Striatum (STR) und retrosplenialen Kortex (RSC) der rechten Hirnhemisphären von Kontrolltieren (C) und von 7 Tage alten Ratten nach 2, 6, 12 und 24std Hyperoxie (80% O₂) mit Hilfe der RT-PCR analysiert. Das Dichteverhältnis wurde in Relation zum internen Standard β-Actin gesetzt (n = 6 pro Kontrolle und Zeiteinheit). Sauerstoffexposition triggert eine verstärkte Transkription des IL-18-Rezeptors mit einem Maximum nach 6std und einem Abfall auf die Ausgangswerte nach 24std Hyperoxie.

4.4.4. Transkription des antiinflammatorischen IL-10 nach Hyperoxie

Die Untersuchung der mRNA-Expression von IL-10, einem Interleukin mit antiinflammatorischen Eigenschaften, zeigt einen klaren Anstieg nach 2std mit einem Maximum nach 6std Hyperoxie. Wie bei den zuvor beschriebenen inflammatorischen Interleukinen IL-1_

und IL-18 (s. Kapitel 4.4.2.) kam es auch hier nach 24std Sauerstoffexposition zu einem Erreichen der Ausgangswerte.

A)



B)

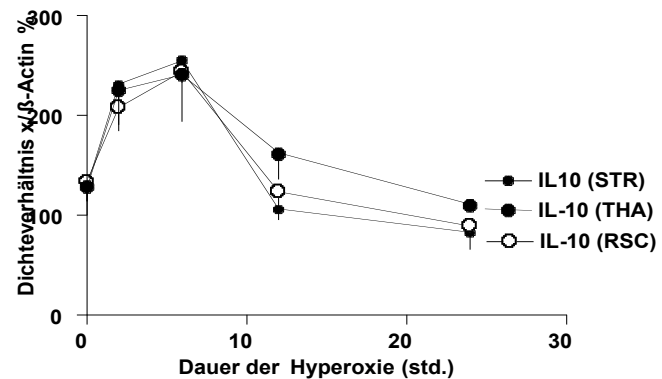


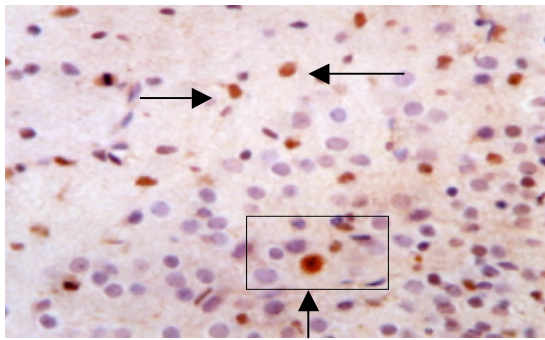
Abbildung 14: Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von IL-10.

A) Das Polyacrylamidgel zeigt die gesteigerte mRNA-Expression von IL-10 im rechten Thalamus 7 Tage alter Ratten nach Hyperoxie. **B)** Untersucht wurde die mRNA-Expression bei Kontrollratten (C) und bei Ratten nach 2, 6, 12 und 24std ($n = 6$ pro Zeiteinheit und Kontrolle) Hyperoxie (80%ige Sauerstoffkonzentration). Eine vermehrte IL-10-Transkription konnte in allen drei untersuchten Hirnregionen Thalamus (THA), Striatum (STR) und Kortex (RSC) der rechten Hirnhemisphären festgestellt werden, mit einem signifikanten Anstieg nach 2std und einer maximalen Steigerung nach 6std O_2 -Exposition.

4.4.5. Gesteigerte Aktivität von Caspase-3 nach Hyperoxie

Die Immunoreaktivität wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen die aktive P20-Untereinheit von Caspase-3 in in Paraffin gelagerten Hirnschnitten von 7 Tage alten Ratten nach 6 ($n = 4$), 12 ($n = 4$) und 24 ($n = 4$) Stunden Hyperoxie analysiert. In den gefärbten Präparaten konnte immunhistochemisch eine starke Steigerung der Caspase-3-Aktivität festgestellt werden. 12std Sauerstoffexposition war die optimale Zeit zur Visualisierung der weit verbreiteten Verteilung der Caspase-3-Aktivität in vielen Hirnregionen. Die Caspase-3-Immunbindung stieg vor allem in den kortikalen Neuronen und im Thalamus. Ebenso gab es Caspase-3-positive Zellen im Striatum und in der periventrikulären weißen Substanz.

A)



B)

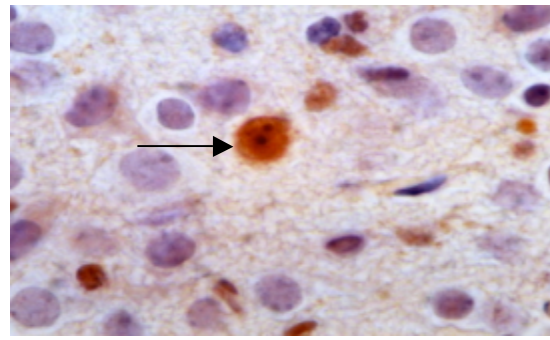


Abbildung 15: Aktivierte Caspase-3 nach 12std Sauerstoffexposition (80%).

A) In der immunhistochemischen Färbung fanden sich viele Caspase-3-positive Zellen. Hier wurden drei Zellen beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet. **B)** Der vergrößerter Ausschnitt zeigt immunopositive Zellen für aktivierte Caspase 3 mit apoptotischen Veränderungen der Nuclei. Die Abbildungen zeigen eine gesteigerte Immunbindung von Caspase-3 im laterodorsalen Thalamus, in Abb. A mit 120facher, in Abb. B mit 200facher Vergrößerung.

5. DISKUSSION

5.1. ALLGEMEINE BETRACHTUNG

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Exposition des sich entwickelnden Rattengehirns mit hohen Sauerstoffkonzentrationen in einer Zeitspanne von Stunden eine massive apoptotische Neurodegeneration zur Folge hat. Die neurodegenerativen Veränderungen betrafen eine große Anzahl von Neuronen in mehreren wichtigen Regionen des sich entwickelnden Gehirns. Es zeigte sich, dass Hyperoxie Einfluss auf verschiedene Faktoren ausübt, die im neuronalen Überleben eine entscheidende Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde ein neues Tiermodell etabliert, um Auswirkungen von Hyperoxie auf das unreife Gehirn zu untersuchen. Wegen der Ähnlichkeit zum menschlichen Gehirn wurden Wistar-Ratten als experimentelles Modell ausgesucht. 6 Tage alte Ratten wurden definierte Zeiträume (2–72std) mit 80% Sauerstoff exponiert.

Es wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot der Beweis erbracht, dass es durch hyperoxische Bedingungen zu Veränderungen der Genexpressionen und Phosphorylierung von Proteinen kommt, die das neuronale Überleben während der Entwicklung kontrollieren. So führte Hyperoxie zu einer verminderten Synthese von BDNF, NGF, NT-3 und GDNF und reduzierte auf Proteinebene die aktivierten Formen von Akt und MAPK nach bestimmten Zeiträumen, was ein Ungleichgewicht der neuroprotektiven und neurodestruktiven Mechanismen zur Folge hat. In der Periode des rapiden Hirnwachstums, in der die physiologische Eliminierung von Gehirnzellen ein wichtiger Bestandteil ist, führt ein solches Ungleichgewicht zu vermehrter pathologischer apoptotischer Neurodegeneration.

Neben dem histologischen Bild apoptotischer Zellen zeigten die untergegangenen Zellen auch eine vermehrte Expression des Todesrezeptors Fas und eine gesteigerte Spaltung der Effektorcaspase-3 als weiteren spezifischen Nachweis, dass es infolge von Hyperoxie zum apoptotischen Zelltod kommt.

In dieser Arbeit wurden darüber hinaus andere mögliche Mechanismen untersucht, die nach Exposition mit hohen Sauerstoffkonzentrationen zu Schädigungen des sich entwickelnden Rattengehirns beitragen. Es zeigte sich innerhalb weniger Stunden ein deutlicher Anstieg von IL-1 α und IL-18, zwei Caspase-1-abhängigen inflammatorischen Zytokinen, sodass man davon

ausgehen kann, dass zusätzlich eine starke inflammatorische Antwort zu vermehrter Neurodegeneration führt.

Auch das untersuchte antiinflammatorische IL-10 zeigte einen signifikanten Anstieg, was als möglicher Kompensationsmechanismus gesehen werden kann.

5.2. HYPEROXIE FÜHRT ZU APOPTOSE

5.2.1. Apoptotische Neurodegeneration als Folge von Hyperoxie im sich entwickelnden Rattengehirn

Die Ergebnisse zeigen, dass die Exposition des sich entwickelnden Rattengehirns mit hohen Konzentrationen von Sauerstoff in einem Zeitraum von wenigen Stunden zu einer neurodegenerativen Reaktion führt, in deren Folge es zu einem massiven Absterben einer großen Anzahl von Neuronen in mehreren wichtigen Hirnregionen kommt. Ein maximales Vorkommen apoptotischer Neurodegeneration wurde nach 24std Hyperoxie beobachtet. Die schematische Darstellung zeigt eine disseminierte Verteilung des durch Hyperoxie induzierten Zelltodes in den Rattengehirnen (s. Abb.6F). Betroffen sind kortikale Areale, die Basalganglien, Hypothalamus, Hippocampus und Bahnen der weißen Substanz.

Eine Vielzahl von Studien haben die vorherrschende Rolle der Apoptose als Zelltod im unreifen Gehirn hervorgehoben¹²⁶. Dass es sich bei der durch Hyperoxie induzierten Neurodegeneration um einen apoptotischen Zelltod handelt, wurde in dieser Arbeit durch histologische, immunhistochemische und molekulare Studien bestätigt. Degenerierte Zellen wurden mit Hilfe der DeOlmos Kupfersilberfärbung und der TUNEL-Technik sichtbar, und es zeigten sich deutlich die morphologischen Kennzeichen eines apoptotischen Zelltodes.

5.2.2. Einfluss von O₂ auf Fas und Caspase-3

Weitere Beweise für Apoptose als Ursache der Neurodegeneration wurden auf molekularer Ebene erbracht, indem Faktoren, die Teil der apoptotischen Zelltodkaskade sind, analysiert wurden. Mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot zeigte sich eine Hochregulierung des Zelloberflächenrezeptors Fas, über welchen es zur Aktivierung des extrinsischen Weges der Apoptose kommt. Darüber hinaus fand sich die aktivierte Form der Effektorcaspase-3 in Neuronen mit morphologischen Zeichen von Apoptose, hinweisend auf das Endstadium der Selbstzerstörungsmaschinerie¹²⁷. Die Proteinexpression von Fas zeigte sich in denselben

Hirnregionen, in denen sich durch die histologische Auswertung vermehrt apoptotische Neurodegeneration darstellte, vor allem in Kortex und Thalamus. Beide Faktoren werden im unreifen Gehirn konstitutionell exprimiert^{128, 129}. Fas und Caspase-3 initiieren und exekutieren die apoptotische Kaskade in einer Reihe von Krankheitsmodellen im adulten wie auch im sich entwickelnden Gehirn^{130, 131, 132}.

In dieser Studie wurde die Aktivität von Fas und Caspase-3 zusätzlich zu den histologischen Methoden ausgesucht, als repräsentative Marker der Apoptose im vorliegenden Modell der Sauerstofftoxizität im sich entwickelnden Gehirn. Die Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung des Todesrezeptors und der Caspase hin, schließen jedoch nicht die Möglichkeit aus, dass andere Zelltod und -überleben fördernde Faktoren der Apoptosemaschinerie ebenfalls zu dem Hyperoxie-induzierten Zelltod im unreifen Gehirn beitragen.

5.2.3. Gesteigerte Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns für Hyperoxie

In den letzten Jahren wurden mehr und mehr „stillere“ Auslöser des Zelltodes im sich entwickelnden Gehirn entdeckt und untersucht. So wurde beschrieben, dass Wirkstoffe, welche als Sedativa⁹⁹, Anästhetika^{100, 133} oder Antikonvulsiva¹³⁴ in neonatalen Intensivstationen eingesetzt werden und die physiologische Aktivität der Synapsen verändern, als Antagonisten am N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptor (Ketamin, N₂O), als Agonisten am GABA_A-Rezeptor (Barbiturate, Benzodiazepine, Anästhetika) oder als Natriumkanalblocker (Phenytoin, Valproinsäure) massive apoptotische Neurodegeneration in infantilen Ratten- und Mäusegehirnen auslösen können. Dieser neurotoxische Effekt in Nagetieren ist streng begrenzt auf einen Entwicklungsabschnitt, der als Periode des rapiden Hirnwachstums (s. Kapitel 1.4.) beschrieben wird. Beim Menschen beginnt diese Periode pränatal und hat ihren Höhepunkt zum Zeitpunkt der Geburt^{95, 99, 100, 134}.

Genaue Mechanismen, welche der gesteigerten Sensitivität des unreifen Gehirns gegen schädigende Einflüsse zugrunde liegen, sind bisher weitgehend unbekannt. Man geht unter anderem davon aus, dass entwicklungsbedingte Veränderungen im NMDA-Rezeptorsystem eine Rolle spielen. Das Tiergehirn hat eine gesteigerte Empfindlichkeit in der ersten Lebenswoche, was mit einer hypersensitiven Phase mit maximaler Vulnerabilität am siebten postnatalen Tag für NMDA übereinstimmt⁹⁶. Neuere Studien vermuten, dass das neuronale Überleben über den NMDA-Rezeptor während des frühen neonatalen Lebens unterstützt wird¹⁰⁰. Dies lässt sich auf signifikante entwicklungsbedingte Veränderungen der NMDA-Rezeptoruntereinheiten zurückführen¹³⁵.

Ein Grund für eine erhöhte Empfindlichkeit des sich entwickelnden Gehirns gegen Sauerstoff ist ein unreifes zelluläres Antioxidationssystem^{136, 137}. So sind frühgeborene neonatale Tiere nicht in der Lage, Antioxidationssysteme wie die Superoxiddismutase, Katalase oder Glutathionperoxidase nach exzessiver Sauerstoffexposition adäquat hochzuregulieren¹². Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass Hyperoxie im unreifen Gehirn eine massive Produktion von freien Sauerstoffradikalen, wie iNOS und Peroxynitrat, induziert¹³⁸. In neuen Studien konnte eine Modulation der NMDA-Rezeptorfunktion durch freie Sauerstoffradikale nachgewiesen werden¹³⁹.

Interessanterweise scheinen auch alte Tiere empfindlich gegen Sauerstofftoxizität zu sein, was auf eine Abnahme der intrazellulären Antioxidations-Schutzmechanismen zurückzuführen ist¹⁴⁰. Darüber hinaus sind menschliche Frühgeborene eventuell besonders empfindlich für schädigende Effekte von Sauerstoff. Dies liegt vor allem daran, dass für Frühgeborene die postnatalen Konditionen mit arteriellen Sauerstoffpartialdrücken (PaO_2) von 50–70 Torr immer hyperoxisch sind verglichen mit intrauterinen Bedingungen, wo der durchschnittliche PaO_2 ca. 32 Torr in der Umbilikalvene und 22 Torr in der Aorta descendens beträgt^{141, 142}.

Studien des Gehirns mit Magnetresonanz-Spektroskopie zeigen, dass der zerebrale Metabolismus bei frühgeborenen Kindern im Vergleich zu reifen Neugeborenen differiert^{143,144}. Es zeigt sich also, dass Neurone besonders in der Phase des rapiden Hirnwachstums eine gesteigerte Empfindlichkeit gegen viele Einflüsse haben. Dadurch ergibt sich die Gefahr, dass menschliche Frühgeborene durch verschiedene Behandlungen, die beim erwachsenen Patienten als ungefährlich gelten, iatrogen Hirnschädigungen erleiden. Hyperoxie könnte in diesem Zusammenhang, besonders in Anbetracht der erhöhten Empfindlichkeit des sich entwickelnden Gehirns für Sauerstoff, ein besonders potenter Auslöser diffuser Neurodegeneration im Gehirn Frühgeborener sein.

5.3. HYPEROXIE FÜHRT ZUR HERABREGULIERUNG DER WACHSTUMSFAKTOREN

Die Ergebnisse zeigen, dass es durch Hyperoxieexposition zu Veränderungen der Genexpression und Phosphorylierung der Proteine kommt, die das neuronale Überleben während der Entwicklung kontrollieren. Hyperoxie führt zu einer stark verminderten Synthese von BDNF, NGF, und NT-3 und reduziert die aktiven Formen von Akt und MAPK. Zwischen 2 und 6std

Sauerstoffexposition kam es zu einem maximalen Abfall der mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren, die nach 24std wieder den Ausgangswert erreichte. Dazu korrelierte auf Proteinebene der Abfall der Proteinexpression von Akt und MAPK im Western Blot mit einem Maximum nach 12std.

Diese Veränderungen bringen eine Schwäche der überlebensfördernden Signale zum Ausdruck und ein Ungleichgewicht zwischen neuroprotektiven und neurodestruktiven Mechanismen im Gehirn¹⁴⁵. Dieses fördert in einer sensiblen Entwicklungsphase, die durch eine ständige physiologische Eliminierung von Gehirnzellen geprägt ist, massiv den apoptotischen Zelltod. Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass Hyperoxie zu Schädigungen der unreifen Lunge und Retina führt. Sauerstofftoxizität ist beteiligt an der Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie und der Retinopathie Frühgeborener^{2, 3}. Apoptose wurde als eine der Zelltodformen identifiziert, die im Kontext mit Hyperoxie-induzierten Organschädigungen auftreten^{146, 93, 147}. Studien haben gezeigt, dass der apoptotische Zelltod in Lunge und Retina, ausgelöst durch Hyperoxie, durch die Aktivierung von ERK1/2 (einem Mitglied der MAPK-Familie) und Akt und durch Wachstumsfaktoren eingedämmt werden kann^{93, 146, 147}. Eine pathogenetische Rolle von oxidativem Stress, induziert durch Hyperoxie, wurde ebenfalls beschrieben¹⁴⁸.

In dieser Arbeit werden die gleichen Mechanismen identifiziert, die zu dem durch Hyperoxie induzierten apoptotischen Zelltod im sich entwickelnden Nagetiergehirn führen, wie sie in anderen Organen beschrieben wurden. Es wird gezeigt, dass Hyperoxie die endogene Neurotrophinsynthese hemmt. Da der apoptotische Zelltod, ausgelöst durch Hyperoxie, in den oben genannten Studien durch Wachstumsfaktoren eingedämmt werden konnte, liegt es nahe, dass die in dieser Arbeit aufgezeigte massive Verminderung der Neurotrophinexpression und der aktivierten Formen von Akt und ERK eine vermehrte Apoptose zur Folge hatte.

Ergebnisse von Tierstudien über die Neurotrophinexpression unter pathologischen Bedingungen im unreifen Gehirn sind teilweise kontrovers und abhängig von der Schädigungsart und von dem verwendeten experimentellen Modell. Bei durch Pilocarpin induzierten Krampfanfällen und traumatischen Verletzungen des sich entwickelnden Gehirns wurde eine Hochregulierung der Neurotrophine beobachtet^{149, 150}, wohingegen Ethanol und Antiepileptika zu einer Verminderung der Neurotrophine führten^{134, 151}. Darüber hinaus hatte die intrazerebroventrikuläre Injektion von BDNF eine signifikante protektive Wirkung auf das unreife Gehirn in einem hypoxisch-ischämischem Modell¹⁵².

Der Anstieg der Expression der Wachstumsfaktoren und von Akt und ERK1/2 nach 24std auf den Ausgangslevel zurück ist wahrscheinlich auf endogene Kompensationsmechanismen zurückzuführen. Möglicherweise kam es zu einer gesteigerten Neurotrophinexpression

umliegender, nicht geschädigter Neurone. Letztlich bleiben diese Mechanismen in dieser Arbeit jedoch ungeklärt.

Ebenso bleiben andere Mechanismen ungeklärt, die im Rahmen dieser Versuche nicht untersucht wurden, wie z.B. der des *silencing of survival signals* (SOSS) über eine Rezeptormodulation durch proinflammatorische Zytokine. Es ist bekannt, dass proinflammatorische Zytokine die Synthese von antiinflammatorischen Zytokinen inhibieren. Einige Studien zeigen aber, dass sie auch die intrazellulären Aktionen anderer Rezeptoren hemmen können^{153, 154}. So inhibieren TNF- α und IL-1 möglicherweise die Fähigkeit des phosphorylierten IGF-1-Rezeptors, die PI(3)-Kinase zu aktivieren¹⁵⁵. Es ist nicht auszuschließen, dass es über die hier untersuchten proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-18 in dieser Weise zu einer Modulation der Trk-Rezeptoren kam, was zusätzlich zu einer Minderung der überlebensfördernden Signale führte.

5.4. HYPEROXIE FÜHRT ZUR GESTEIGERTEN EXPRESSION VON CASPASE-1-ABHÄNGIGEN INFLAMMATORISCHEN ZYTOKINEN

In den letzten Jahren ist durch das Erforschen der genauen Pathomechanismen von diversen Formen der Neurodegeneration die Bedeutung und Einflussnahme der Zytokine immer mehr in den Vordergrund getreten¹⁵⁶. Immunologen haben nach und nach ein Zytokinkonzept entwickelt, das die komplizierten Zusammenhänge der einzelnen Faktoren zu erfassen versucht. Es zeigt, wie schnell die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen ins Schwanken gerät und damit zu über das neuronale Überleben alles entscheidenden Vorgängen führen kann. Erhöhte Zytokinwerte im Nabelschnurblut von Frühgeborenen wurden mit neurologischen Defiziten in Zusammenhang gebracht, die bei Nachuntersuchungen dieser Kinder festgestellt wurden³⁶.

Eine gesteigerte Produktion von inflammatorischen Zytokinen im Gehirn ist Teil von vielen Neuropathologien, so z.B. des demenziellen AIDS-Syndroms, des Schlaganfalls, des Traumas, der Multiplen Sklerose und der Alzheimer-Krankheit^{157, 158, 159, 160, 161}.

Eine erhöhte IL-18-Produktion findet sich nach Ischämie/Reperfusion in der Niere⁵² und im Herzen¹⁶². Dass IL-18 auch eine bedeutende Rolle in Mechanismen der Hirnschädigung spielt, wurde in neueren Studien beschrieben. Nach Ischämie konnten deutlich gesteigerte Konzentrationen von Caspase-1 und von den von ihr abhängigen Interleukinen IL-18 und IL-1 α nachgewiesen werden⁶³. Darüber hinaus fand sich eine Reduktion der Hirnschädigung in IL-18-defizienten Mäusen, sodass eine bedeutsame Beteiligung dieses Zytokins an einer Entzündungsreaktion der Mikroglia nach Ischämie wahrscheinlich ist^{163, 69}. Diese Vermutung

wird durch neuere Studien bestätigt, die zeigen, dass das IL-18-bindende Protein protektive Wirkungen in einem Modell zur myokardialen Ischämie aufweist¹⁶².

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass es auch infolge von Hyperoxie zu einem deutlichen Anstieg dieser Caspase-1-abhängigen inflammatorischen Interleukine kommt. IL-18 und IL-1 β wie auch der IL-18-Rezeptor zeigen im retrosplenialen Kortex, Thalamus und Striatum bereits nach 6std einen maximalen mRNA-Konzentrationsanstieg, was nahe legt, dass Sauerstofftoxizität zu einer schnellen Entzündungsantwort führt. In einer Studie von Hedtj rn kam es im Gehirn von 7 Tage alten Ratten erst 14 Tage nach Hirninfarkt zu einem maximalen Anstieg der mRNA von IL-18, während IL-1 β sein erstes Maximum 8std und sein zweites 6–14 Tage nach dem Insult zeigte⁶³. Auch andere Studien zeigen deutliche Unterschiede in der Immunantwort zwischen IL-1 β und IL-18. Nach traumatischen Hirnschädigungen zeigte IL-1 β (wie auch andere proinflammatorische Zytokine, so z.B. TNF und IL-6) eine deutlich schnellere Immunantwort als IL-18 mit einem Anstieg innerhalb der ersten Stunden nach Traumasetzung, während IL-18 einen maximalen Anstieg nach 7 Tagen hatte. Die Zytokine der frühen Immunantwort zeigten allerdings nur lokal in der geschädigten Hemisphäre einen Anstieg, während in der kontralateralen Seite kein Anstieg nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu war der Anstieg von IL-18 diffus auch in der kontralateralen, nicht geschädigten Hirnhemisphäre nachzuweisen¹⁶⁴.

In unseren Versuchen zeigten beide Interleukine einen Anstieg bereits nach 2std Hyperoxie und sanken nach 24std auf den Ausgangswert zurück. Dieser Zeitraum stimmt mit den neurodegenerativen Vorgängen überein, die nach 2std Sauerstoffexposition begannen und nach 24std ihren maximalen Anstieg hatten. Möglicherweise führten Kompensationsmechanismen wie ansteigende antiinflammatorische Zytokine zu der Reduktion nach 24std (s.u.).

Die bedeutende Rolle von IL-1 β in hirnsch digenden Prozessen ist inzwischen gut erforscht^{165,166}, und die Interaktion mit IL-18 scheint dabei eine große Wichtigkeit zu haben.

Beide Zytokine teilen viele Eigenschaften, und es wird angenommen, dass IL-18 die proinflammatorischen Effekte von IL-1 β potenziert. IL-18 induziert die Produktion von IL-1 β (und des TNF- α)⁵⁴, und beide Zytokine bewirken über den gleichen intrazellulären Signalweg eine Aktivierung von NF- κ B, was zu einer Induktion von proinflammatorischen Genen wie z.B. iNOS führt und so zu Schädigungen des unreifen Gehirns beitr gt^{55, 63, 64}.

Möglicherweise kommt es zu dieser inflammatorischen Reaktion über eine gesteigerte Caspase-1-Aktivität, ausgelöst durch andere Mechanismen, die infolge von O₂-Toxizität zu Apoptose führen. Wie oben beschrieben, kommt es durch Hyperoxie zu einem Abfall der Wachstumsfaktoren und zu einer gesteigerten Expression des Todesrezeptors Fas, was zu

vermehrter Apoptose und eventuell zu einer gesteigerten Caspase-1-Expression führt. Hyperoxie scheint also in einem Zeitraum von 24std über verschiedene, sich gegenseitig potenzierende Mechanismen zur massiven Neurodegeneration zu führen.

Allerdings wird die Aktivität von Caspase-1 im Rahmen von Studien über Hirnschädigungen kontrovers diskutiert. In einigen Untersuchungen wurde keine gesteigerte Aktivität von Caspase-1 nach Schädigungen des neonatalen oder adulten Gehirns beschrieben^{167, 168}. Dennoch kam es nach intrazerebroventrikulärer Gabe eines selektiven Caspase-1-Inhibitors (Ac-YVAD-cmk) zur Reduktion der Neurodegeneration in verschiedenen *in vivo* Studien über ischämische^{169, 170} und traumatische Hirnschädigungen¹⁷¹. Die Wichtigkeit von Caspase-1 als Vermittler in hirnschädigenden Prozessen wurde auch in Versuchen mit Mäusen mit einem Mangel am Caspase-1-Gen gezeigt. Sowohl in neonatalen als auch in adulten Tieren wirkte der Mangel an Caspase-1 protektiv gegen Ischämie^{172, 60}. In Mäusen ohne Caspase-1 kam es nicht zur Produktion von reifem IL-1_β oder IL-18⁶¹, und momentan sind IL-1_β und IL-18 die einzig bekannten Substrate für Caspase-1. Sowohl Caspase-1 als auch seine beiden Substrate werden von der Mikroglia exprimiert, welche in inflammatorischen und pathologischen Prozessen im Gehirn nach Ischämie eine wichtige Rolle spielt¹⁷³. Eine interessante Frage könnte daher sein, ob und wie stark die apoptotische Neurodegeneration nach Hyperoxie durch die Inhibition von Caspase-1 und damit auch von IL-1_β und IL-18 zu reduzieren wäre.

Neuere Studien haben sich auch mit dem möglichen protektiven Nutzen des IL-18-bindenden Proteins befasst. Das IL-18-bindende Protein (IL-18BP) ist ein natürlich vorkommender, spezifischer Inhibitor von IL-18^{174, 175}. IL-18BP ist in der Lage, IL-18 mit einer hohen Affinität und Effektivität zu binden, und inhibiert dessen biologische Aktivität wie z.B. die IL-18-vermittelte frühe Th1-Zytokinantwort^{176, 177, 178}. Die systemische Gabe von IL-18BP nach Hirntrauma führte bei Mäusen zu einer signifikant besseren neurologischen Entwicklung innerhalb von 7 Tagen. Keinen Einfluss zeigte die IL-18BP-Gabe allerdings auf frühe pathologische Veränderungen wie die Entwicklung eines Hirnödems nach 24std, vermutlich weil zu diesem Zeitpunkt andere proinflammatorische Zytokine eine entscheidendere Rolle spielen. Die Neutralisation von IL-18 durch die Gabe des IL-18-bindenden Proteins zeigte auch einen protektiven Schutz bei durch Endotoxin oder Ischämie induzierten Leberschädigungen¹⁷⁹. IL-18-knock-out-Mäuse zeigten ein deutlich reduziertes Infarktvolume verglichen mit Kontrolltieren⁶³.

Aufgrund dieser Vorkenntnisse stellt sich auch im Rahmen der Hyperoxie-induzierten Neurodegeneration die Frage, ob man durch die Gabe von IL-18BP das Ausmaß der Schädigung reduzieren und damit eine bessere neurologische Entwicklung der Frühgeborenen erreichen

könnte. Da IL-18BP spezifisch IL-18 inhibiert und köpereigen vorkommt, hat es möglicherweise weniger Nebenwirkungen als andere therapeutische Versuche, die proinflammatorischen Wirkungen der Zytokine zu reduzieren.

5.5. HOCHREGULIERUNG VON IL-10 ALS MÖGLICHER ENDOGENER KOMPENSATIONSMECHANISMUS

Neben dem Anstieg der inflammatorischen Zytokine zeigte sich auch ein deutlicher Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Der zeitliche Verlauf ähnelt dem von IL-1 α und IL-18 mit einem maximalen Anstieg der mRNA-Konzentration nach 6std Hyperoxie und einem Abfall auf die Ausgangskonzentration nach 24std. Allerdings zeigt sich bereits nach 2std Sauerstoffexposition ein drastischerer Anstieg der mRNA von IL-10 verglichen mit den proinflammatorischen Zytokinen.

IL-10 wird im ZNS von Astrozyten und den Zellen der Mikroglia synthetisiert und hat eine bedeutende Funktion für Überleben und Wiederherstellung der Neurone, indem es die Effekte der proinflammatorischen Zytokine blockiert und Signale für das Zellüberleben fördert^{180, 181}. Die Stimulation des IL-10-Rezeptors führt über mehrere Signalwege, wie über JTK (Janus-Tyrosin-Kinase), MAPK und NF- κ B, zur Inhibition sowohl der extrinsischen, getriggert durch Ligandenbindung (z.B. Fas und TNF), als auch der intrinsischen, mitochondrial ausgelösten apoptotischen Kaskade¹⁸². IL-10 führt wahrscheinlich über gleiche Mechanismen wie die Wachstumsfaktoren zu neuroprotektiven Effekten. So schützen z.B. BDNF und IL-10 vor dem glutamatvermittelten Zelltod, indem sie den schädigenden Anstieg der freien Ca²⁺-Konzentration im Zytosol eindämmen^{77, 82, 183}. Darüber hinaus ist IL-10 in der Lage, das Fortschreiten der Apoptose in immungeschwächten Zellen zu verlangsamen¹⁸⁴ und die neurologische Entwicklung nach ZNS-Trauma durch Reduktion der Apoptose zu verbessern^{72, 73}.

Caspase-3 spielt eine wichtige Rolle in der glutamatvermittelten Apoptose^{185, 186}. Bachis et al. zeigten in ihrer Studie 2001, dass IL-10 einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität, vermittelt durch Glutamat, verhindern kann. Darüber hinaus induziert IL-10 innerhalb von Stunden einen rapiden Abfall der Caspase-3-Aktivität, unabhängig von dem mangelnden Ca²⁺, durch welches die Caspase-3-Aktivität moduliert wird¹⁸⁷. Es scheint also so zu sein, dass IL-10 eine intrinsische Möglichkeit hat, die Caspase-3-Aktivität direkt oder indirekt zu hemmen; ein Mechanismus, der die neuroprotektiven Eigenschaften von IL-10 *in vivo* erklären könnte^{72, 73, 188}.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, kommt es infolge von Hyperoxie zu einem deutlichen Anstieg der aktivierten Caspase-3. Möglicherweise kommt es als kompensatorische Reaktion auf diesen Anstieg zu dieser rapiden Erhöhung der IL-10-Konzentration im sich entwickelnden Rattengehirn. Bisher ist noch nicht bekannt, inwieweit IL-10 andere Caspasen beeinflusst. Möglicherweise ist IL-10 in der Lage, auch weitere Caspasen wie z.B. Caspase-1 zu inhibieren, was zu den abfallenden Konzentrationen von IL-1 β und IL-18 beitragen könnte.

IL-10 ist zusätzlich noch über andere Mechanismen in der Lage, neuroprotektiv zu wirken, die eventuell ebenfalls zu einer Reduktion der Apoptose nach Hyperoxie im unreifen Gehirn beitragen. So spielt die Suppression der NF- κ B Bindungsaktivität an DNA¹⁸⁴ und die verminderte Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF- α durch IL-10 sicher ebenfalls eine entscheidende Rolle des antiinflammatorischen Effekts^{74, 75, 189, 190}.

Ein kompensatorischer Anstieg der antiinflammatorischen Mechanismen könnte dafür verantwortlich sein, dass es zu einer Wiederherstellung der zellulären Homöostase und einer Limitierung des neuronalen Verlustes kommt. Die Hochregulierung antiinflammatorischer Zytokine repräsentiert möglicherweise endogene Mechanismen, die den durch Hyperoxie ausgelösten apoptotischen Prozess limitieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Sauerstoff ist ein wichtiger Bestandteil in vielen Bereichen der Behandlung Neugeborener, wie z.B. bei der Wiederbelebungen, bei der Behandlung des *respiratory distress syndrome*, der pulmonalen Hypertension und im Rahmen der Kardiochirurgie. Besonders bei Frühgeborenen, die noch über kein reifes Antioxidationssystem verfügen, werden leicht hyperoxische Bedingungen geschaffen. Bekannte Folgen von Sauerstofftoxizität bei Frühgeborenen sind bisher die Retinopathie (*retinopathy of prematurity*, ROP) und die bronchopulmonale Dysplasie. Die rasanten Fortschritte in der neonatalen Intensivmedizin haben zwar die Überlebenschancen von Frühgeborenen enorm verbessert, aber auch viele Probleme und Fragen aufgeworfen. Die neurologische Morbidität bei Frühgeborenen ist beträchtlich. In vielen Fällen bleibt die Ursache der kognitiven und motorischen Defizite unklar.

In dieser Arbeit konnte am unreifen Rattengehirn nachgewiesen werden, dass eine 80%ige Sauerstoffkonzentration in der Atemluft zu einer ausgeprägten, diffusen apoptotischen Neurodegeneration im Gehirn führt. Nach 24std erreichten die neurodegenerativen Vorgänge ihr Maximum, danach konnte ein Rückgang der Apoptose beobachtet werden.

Es konnte deutlich dargestellt werden, dass Hyperoxie Einfluss nimmt auf die Expression von apoptotischen Genen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen und so über verschiedene Mechanismen und Signalwege zu einem Ungleichgewicht der über das neuronale Überleben entscheidenden Faktoren führt.

Die Exposition mit hoher Sauerstoffkonzentration führte im unreifen Rattengehirn zu einer deutlich verminderten Expression der Neurotrophine BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*) und NT-3 (*neurotrophin 3*) im retrosplenialen Kortex, Striatum und Thalamus. Ein maximaler Abfall der Wachstumsfaktorexpression konnte nach 6–12std beobachtet werden, ebenso ein Wiederanstieg nach 24std Hyperoxie auf den Ausgangswert. In der durch die Neurotrophine aktivierten Signalkaskade fand sich ein Abfall der ERK1/2- und Akt-Phosphorylierung, mit einem gleichen Verlaufsschema wie bei den Neurotrophinen. Allein durch Wegfall dieser für das neuronale Überleben entscheidenden Signale lässt sich die massiv auftretende Apoptose erklären.

Als spezifischer Nachweis für eine apoptotische Neurodegeneration wurden neben dem histologischen Verfahren auf molekularer Ebene apoptotische Gene untersucht. Unter Hyperoxie kam es zu einer erhöhten Expression des Todesrezeptors Fas und einer gesteigerten Aktivität von Caspase-3.

Des Weiteren fand sich infolge der Hyperoxieexposition ein drastischer Anstieg der inflammatorischen Zytokine IL-1_α und IL-18, welche im Rahmen von Neurodegeneration zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Als Reaktion auf die veränderten Genexpressionen der Faktoren scheint es endogene Kompensationsmechanismen zu geben, wie es z.B. anhand des deutlichen Anstiegs von IL-10 zu sehen ist, welche den Wiederanstieg der Wachstumsfaktoren erklären könnten. Diese bleiben jedoch weitgehend unklar.

Es zeigt sich also, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen in einer sehr vulnerablen Phase der Hirnentwicklung (Phase des rapiden Hirnwachstums, „*brain growth spurt period*“) zu massiven Veränderungen führen, welche den bisher ungeklärten diffusen Neuronenuntergang bei Frühgeborenen erklären könnten.

Es bleibt zu klären, ab welchen Sauerstoffkonzentrationen es zu diesen fatalen Veränderungen der Genexpressionen kommt und welche therapeutischen Interventionen möglich wären, etwa die Gabe des IL-18-bindenden Proteins (IL-18BP), um die apoptotischen Vorgänge einzudämmen.

Die vorliegenden Ergebnisse implizieren äußerste Vorsicht bei der therapeutischen Anwendung von Sauerstoff bei Frühgeborenen, für die die postnatalen Konditionen, verglichen mit den intrauterinen Bedingungen, immer hyperoxisch sind und die noch über ein unreifes Antioxidationsystem verfügen.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin, Adenosin
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
Apaf 1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	<i>adult respiratory distress syndrome</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
Bcl-2-Familie	Proteinfamilie mit anti- und proapoptotischen Mitgliedern, BCL steht für <i>B-cell lymphoma</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
Bp	Basenpaare
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
BSA	bovines Serumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
°C	Grad Celsius
bzw.	beziehungsweise
C	<i>Control</i> (Kontrolltiere)
C	Cytidin, Cytosin
ca.	circa
Ca ²⁺	ionisierte Form von Kalzium
CARDs	<i>Caspase activating recruitment domains</i>
CDNA	<i>complementary DNA</i> / komplementäre DNA
CLD	<i>chronic lung disease</i>
cm	Zentimeter
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DAB	Diaminobenzidin
Dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol

ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELBW	<i>extremely low birth weight infants</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
et al.	et altera
etc.	et cetera
Fas	Zelltodrezeptor, Synonym CD 95 und Apo-1
FIRS	<i>fetal inflammatory response syndrome</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin, Guanosin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDNF	<i>glia-derived neurotrophic factor</i>
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosin-Triphosphat
Hg	chemisches Symbol für Quecksilber
ICE	<i>IL-1 converting enzyme</i>
IFN	Interferone
IGF	insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukine
IL-18BP	Interleukin-18-bindendes Protein
IL-18R	Interleukin-18-Rezeptor
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
JNK	c-Jun N-terminal-Kinase
JTK	Janus-Tyrosin-Kinase
M	Molar
M	Morbus
mA	Milli-Ampere
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
min	Minute (Minuten)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter

MMLV	<i>moloney-murine leukemia virus</i>
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
n	Menge
N ₂ O	Lachgas
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NF- <u>B</u>	<i>nuclear factor <u>B</u></i>
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NT	Neurotrophin
nt	<i>nucleotide</i>
O ₂	chemisches Symbol für molekularen Sauerstoff
p	phosphoryliert
p75 ^{NTR}	p75-Neurotrophinrezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatpuffer)
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PC-Zellen	Zellen aus einer Phäochromozytomzelllinie
PI(3)K	Phosphoinositol-3-Kinase
PVL	periventrikuläre Leukomalazie
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>reactive oxygen intermediates</i>
ROP	<i>retinopathy of prematurity</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RSC	Retrosplenialer Kortex
RSK	pp90-ribosomal-S6-Kinase
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
s	Sekunde(n)

s.	siehe
s.u.	siehe unten
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
std	Stunde(n)
STR	Striatum
T	Thymin, Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
Th1-Zellen	T-Helferzellen-1
THA	Thalamus
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF-6	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
Trk	Tyrosinkinase
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling</i>
U	Unit (1U: Umsatz von 1 Mol Substrat/Minute)
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
V	Volumen
v/v	Volumenprozent
v/w	Gewichtsprozent
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
_g	Mikrogramm
_l	Mikroliter
_M	Mikromolar

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ Iwamoto, HS et al.: Effects of birth-related events on blood flow distribution. *Pediatr Res* 1987;22: 634-640
- ² Gibson, DL et al.: Retinopathy of prematurity-induced blindness : birth weight-specific survival and the new epidemic. *Pediatrics* 1990;86: 405-412
- ³ Saugstad, OD : Chronic lung disease: oxygen dogma revisited. *Acta Paediatr* 2001;90: 113-115
- ⁴ Weinberger, B et al.: Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;181:60-67
- ⁵ Harman, D : Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11 :298-300
- ⁶ Forster, MJ et al.: Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ;93: 4765-4769
- ⁷ Gabbita, SP et al.: Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1998; 71: 2034-2040
- ⁸ Mecocci, P et al.: Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994; 36: 747-751
- ⁹ Polidori, MP et al.: Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neurosci Lett* 1999;272: 53-56
- ¹⁰ Del Maestro, R et al.: Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol.Scand.Suppl.* 1980;492: 43-57
- ¹¹ Jenkinson, SG: Oxygen toxicity. *New Horiz* 1993;1:504-511
- ¹² Frank, L and Sosenko, IRS: Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: Increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits. *Pediatr Res* 1991;29: 292-296
- ¹³ Nishida, A et al.: Developmental expression of copper, zinc-superoxide dismutase in human brain by chemiluminescence. *Brain Dev* 1994;16: 40-43
- ¹⁴ Halliwell, B and Gutteridge, JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press 1999
- ¹⁵ Dorey, CK et al.: Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal vascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 1996 ;114: 1210-1217
- ¹⁶ Aiello, LP: Vascular endothelial growth factor and the eye. *Arch Ophthalmol* 1996;114: 1252-1254
- ¹⁷ Blaymore-Bier, L et al.: Outcome of extremely low-birth-weight infants : 1980-1990. *Acta Paediatr.* 1994;83: 1244-1248
- ¹⁸ Hack, M et al.: Very low birth weight outcomes of the NICHD neonatal network. *Pediatrics* 1991;87: 587-597
- ¹⁹ Emsley, HC et al.: Increased survival and deteriorating developmental outcome in 23 to 25 week old gestation infants, 1990-1994 compared to 1984-1990. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998; 78: F99-F104
- ²⁰ Vohr, BR et al. : Neurodevelopmental and functional outcomes of extremely low birth weight infants in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 1993-1994. *Pediatrics* 2000;105: 1216-1226
- ²¹ Berkowitz, GS and Papiernik, E: Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol Rev* 1993;15: 414-443
- ²² Vexler, ZS and Ferriero, DM: Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatal* 2001;6: 99-108
- ²³ Kirpalani, H and Asztalos, E: Neonatal brain injury. *Curr Opin Pediatr* 2001;13: 227-233
- ²⁴ Maalouf, EF: Comparison of findings on cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in preterm infants. *Pediatrics* 2001;107: 719-727
- ²⁵ Volpe, JJ: Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001;50: 553-562
- ²⁶ Collins, MP et al.: Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. *Pediatr Res* 2001;50: 712-719
- ²⁷ Katoh, S et al: The rescuing effect of nerve growth factor is the result of up-regulation of bcl-2 in hyperoxia-induced apoptosis of a subclone of pheochromocytoma cells, PC12h. *Neurosci Lett* 1997; 29: 71-74

- ²⁸ Taghialatela, G et al.: Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1998;25: 936-942
- ²⁹ Barone, FC and Feuerstein, GZ: Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999 ;19: 819-834
- ³⁰ Del Zoppo, G et al.: Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.*2000;10: 95-112
- ³¹ Stuart, M et al.: Cytokines and acute neurodegeneration. *Neuroscience* 2001;2: 734-744
- ³² Baud, O et al.: Antenatal glucocorticoid treatment and cystic periventricular leukomalacia in very premature infants. *New Engl J Med* 1999;341: 1190-1196
- ³³ Pinto-Martin, JA et al.: Cranial ultrasound prediction of disabling and nondisabling cerebral palsy at age two in a low birth weight population. *Pediatrics* 1995;95: 249-254
- ³⁴ Whitaker, AH: Psychiatric outcomes in low-birth-weight children at age 6 years: relation to neonatal cranial ultrasound. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54: 847-856
- ³⁵ Yoon, BH et al.: Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;117: 19-26
- ³⁶ Nelson, KB et al.: Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol.* 1998;44: 665-675
- ³⁷ Deguch, IK et al.: Characteristic neuropathology of leukomalacia in extremely low birth weight infants. *Pediatr Neurol* 1997;16: 296-300
- ³⁸ Dammann, O et al.: Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitations in children born preterm. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8: 46-50
- ³⁹ Gomez, R et al.: Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997;11: 135-176
- ⁴⁰ Berger, A et al.: Microbial invasion of the amniotic cavity at birth is associated with adverse short-term outcome of preterm infants. *J Perinat Med* 2003;31: 115-121
- ⁴¹ Sonntag, J et al.: Effect of C1-inhibitor in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate* 1999;76:235-241
- ⁴² Kadhim, H et al. : Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001; 56: 1278-1284
- ⁴³ Minagawa, K et al.: Possible correlation between high levels of IL-18 in the cord blood of pre-term infants and neonatal development of periventricular leukomalacia and cerebral palsy. *Cytokine* 2002;17: 164-170
- ⁴⁴ Desmarquest, P et al.: Effect of hyperoxia on human macrophage cytokine response. *Respir Med* 1998 Jul;92 : 951-960
- ⁴⁵ Barazzone, C and White, C: Mechanisms of cell injury and death in hyperoxia: role of cytokines and Bcl-2 family proteins. *Am J Respir Cell Mol Bio* 2000;22: 517-519
- ⁴⁶ Frank, L et al.: Possible mechanism for late gestational development of the antioxidant enzymes in the fetal rat lung. *Biol Neonate* 1996;70: 116-127
- ⁴⁷ Freeman, BA et al.: Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 1981;256: 10986-10992
- ⁴⁸ Li, N and Karin, M.: Is NF-kappa B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 1999;13: 1137-1143
- ⁴⁹ Baeuerle, PA et al.: Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol (Paris)* 1996;44: 29-35
- ⁵⁰ Deaton, PR et al.: Hyperoxia stimulates interleukin-8 release from alveolar macrophages and U937 cells: attenuation by dexamethasone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1994;267: L187-L192
- ⁵¹ Rozycki, HJ et al.: Cytokines and oxygen radicals after hyperoxia in preterm and term alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282: L1222-L1228
- ⁵² Daemen, MA et al.: Ischemia/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: involvement of IL-12 and IL-18. *J Immunol* 1999;162: 5506-5510
- ⁵³ Pierce, BT et al.: The effects of hypoxia and hyperoxia on fetal-placental vascular tone and inflammatory cytokine production. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185: 1068-1072
- ⁵⁴ Dinarello, CA: Interleukin-18. *Methods* 1999;19: 121-132

- ⁵⁵ Lebel-Binay, S et al.: Interleukin-18: Biological properties and clinical implications. *Eur Cytokine Netw* 2000;11: 15-26
- ⁵⁶ Okamura, H et al.: Cloning of a new cytokine that induced IFN- γ production by T cells. *Nature* 1995;378: 281-312
- ⁵⁷ Okamura, H et al.: A novel cytokine that augment both innate and acquired immunity. *Advance Immunol* 1998; 70: 281-312
- ⁵⁸ Nakanishi, K et al.: Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Ann Rev Immunol* 2001;19: 423-474
- ⁵⁹ Tsutsui, H et al.: IL-18 accounts of both TNF- α and Fas ligand mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol* 1997;159: 3961-3967
- ⁶⁰ Liu, XH et al.: Mice deficient in interleukin-1 converting enzyme are resistant to neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19: 1099-1108
- ⁶¹ Wang, J and Lenardo, MJ: Roles of caspases in apoptosis, development and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci* 2000;113: 753-757
- ⁶² Puren, AJ et al.: Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14 $^{+}$ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1998;101: 711-721
- ⁶³ Hedtj rn, M et al.: Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2002;22: 5910-5919
- ⁶⁴ Ikeno, S et al.: Immature brain injury via peroxynitrite production induced by inducible nitric oxide synthase after hypoxia-ischemia in rats. *J Obstet Gynaecol Res* 2000;26: 227-234
- ⁶⁵ Schneider, A et al.: NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med* 1999;5: 554-559
- ⁶⁶ Freshney, NW et al.: Interleukin-1 activates a novel protein cascade that results in the phosphorylation of hsp27. *Cell* 1994;78: 1039-1049
- ⁶⁷ Kracht, M et al.: Interleukin 1 alpha activates two forms of p54 alpha mitogen-activated protein kinase in rabbit liver. *J Exp Med* 1994;180: 20017-2025
- ⁶⁸ Bona, E et al.: Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatr Res* 1999;45: 500-509
- ⁶⁹ Galasso, JM et al.: Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of acute excitotoxic injury in neonatal rat brain. *Neuroscience* 2000;101: 737-744
- ⁷⁰ Dao, T et al.: Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances FAS ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell Immunol* 1996;173: 230-235
- ⁷¹ Hyodo, Y et al.: IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J Immunol* 1999;162: 1662-1668
- ⁷² Knoblach, SM and Faden, AI.: Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 1998;153: 143-151
- ⁷³ Bethea, JR et al.: Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kB activation. *J Neurosci.* 1998;18: 3251-3260
- ⁷⁴ Bogdan, C et al.: Contrasting mechanisms for suppression of macrophages cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin-10. *J Biol Chem* 1992;267: 23301-23308
- ⁷⁵ Wang, P et al.: IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1994;153: 811-816
- ⁷⁶ Choi, DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988;1: 623-634
- ⁷⁷ Bachis, A et al.: Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. *J Neurosci* 2001;21: 3104-3112
- ⁷⁸ Martin, DP et al.: Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol* 1988;106: 829-844
- ⁷⁹ Purves, D: *Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections* (Harvard Press, Cambridge, Massachusetts, 1988)
- ⁸⁰ Cheng, Y et al.: Marked Age-dependent Neuroprotection by Brain-derived Neurotrophic Factor Against Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Ann Neurol* 1997;41: 521-529
- ⁸¹ Holtzmann, DM et al.: NGF protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 1996;39: 114-122

- ⁸² Cheng, B et al.: Basic fibroblast growth factor selectively increases AMPA-receptor subunit GluR1 protein level and differentially modulates Ca^{2+} responses to AMPA and NMDA in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1995;65: 2525-2536
- ⁸³ Yuan, J and Yankner, BA: Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407(6805): 802-809
- ⁸⁴ Yao, R and Cooper, GM: Regulation of the RAS signal pathway by GTPase-activating protein in PC12 cells. *Oncogene* 1995;11: 1607-1614
- ⁸⁵ Philpott, KL et al.: Activated phosphatidylinositol 3-kinase and AKT kinase promote survival of superior cervical neurons. *J Cell Biol* 1997;139: 809-815
- ⁸⁶ Datta, SR et al.: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91: 231-241
- ⁸⁷ Du, K and Montminy, M: CREB is a regulatory target for the protein kinase AKT/PKB. *J Biol Chem* 1998;273: 32377-32379
- ⁸⁸ Kane, LP et al.: Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999;9: 601-604
- ⁸⁹ Bonni, A et al.: Cell survival promoted by the RAS-MAPK signaling pathway by transcription-dependent an-independent mechanisms. *Science* 1999; 286: 1358-1362
- ⁹⁰ Xia, Z et al.: Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270: 1326-1331
- ⁹¹ Lee, R et al.: Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001;294: 1945-1948
- ⁹² Lee, FS et al.: The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11: 281-286
- ⁹³ Buckley, S et al.: ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *AM J Physiol* 1999; L159-166
- ⁹⁴ Dobbin, J et al.: The later growth of the brain and its vulnerability. *Scientific Foundation of Pediatrics* 1974 :565-577
- ⁹⁵ Dobbin J, Sands J: Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum.Dev.* 1979; 3:79-83
- ⁹⁶ Ikonomidou, C et al.: Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity. *J.Neurosci* 1989;9: 2809-2818
- ⁹⁷ Bittigau, P et al. : Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 1999;45: 724-735
- ⁹⁸ Pohl, D et al.: N-methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1999;96: 2508-2513
- ⁹⁹ Ikonomidou, C et al.: Blockade of NMDA receptors an apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999;283: 70-74
- ¹⁰⁰ Ikonomidou C et al.: Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 2000; 287: 1056-1060
- ¹⁰¹ Vaux, DL et al.: Cell death in development. *Cell* 1999;96: 245-254
- ¹⁰² Hengartner, MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407: 770-776
- ¹⁰³ Burek, MJ and Oppenheim, RW: Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 1996;6: 427-446
- ¹⁰⁴ Meier, P et al.: Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407: 796-801
- ¹⁰⁵ Rich, T et al.: Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; 407: 777-783
- ¹⁰⁶ Kerr, JFR et al.: Apoptosis : a basic biological phenomenon with wideranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 ;26: 239-257
- ¹⁰⁷ Ishimaru, M et al.: Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 1999;408: 461-476
- ¹⁰⁸ Li, P at al.: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* 1997;91: 479-489
- ¹⁰⁹ Barinaga, M: Forcing a path to cell death. *Science* 1996;273: 735-737
- ¹¹⁰ Wallach, D: Placing death under control. *Nature* 1997;388: 123-126
- ¹¹¹ Nagat, S: Apoptosis by death factor. *Cell* 1998;88: 355-365
- ¹¹² Borovitskaya, AE et al.: Gamma-radiation-induced cell death in the fetal rat brain possesses molecular characteristics of apoptosis and is associated with specific messenger RNA elevation. *Brain Res* 1996;35: 19-30
- ¹¹³ Mesner, P et al.: A timeable of events during programmed cell death induced by trophic factor withdrawal from neuronal PC12 cells. *J Neurosci* 1995;15: 7357-7366

- ¹¹⁴ Maroto, R et al.: BCL-2 related protein expression in apoptosis: oxidative stress versus serum deprivation in PC12 cells. *J.Neurochem.*1997;69: 514-523
- ¹¹⁵ Green, DR: Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998;281: 1309-1312
- ¹¹⁶ Eilers, A et al.: Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998;18: 1713-1724
- ¹¹⁷ Adams, JM et al.: The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 1998;281: 1322-1326
- ¹¹⁸ Thornberry, N et al.: Caspase –Enemies within. *Science* 1998;281: 1312-1316
- ¹¹⁹ Chomczynski, P and Sacchi, N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
- ¹²⁰ Kaiser AD and Hogness, DS: The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J Mol Biol* 1960;2: 392-415
- ¹²¹ Lohmann, J et al.: REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display mRNA isolation. *Biotechniques* 1995;18: 200-202
- ¹²² De Olmos, J et al. : An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration. *Brain Res* 1971;33: 523-529
- ¹²³ Cruz-Orive, LM et al.: Recent stereological methods for cell biology : a brief survey. *Am J Physiol* 1990;258: L148-L156
- ¹²⁴ Gavrieli, Y et al.: Identification of Programmed Cell Death in situ via specific labeling of nuclear DNA-Fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119: 493-501
- ¹²⁵ Shi, SR et al.: Antigen retrieval immunohistochemistry : past, present, and future. *J Histochem Cytochem* 1997;45: 327-343
- ¹²⁶ Taylor, DL et al.: Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 1999;9: 93-117
- ¹²⁷ Yakovlev, AG and Faden, AI: Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. *Mol Neurobiol* 2001;24: 131-144
- ¹²⁸ Cheema, ZF et al.: Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex : induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci* 1999;19: 1754-1770
- ¹²⁹ Shimohama, S et al.: Differential expression of rat brain caspase family proteins during development and aging. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289: 1063-1066
- ¹³⁰ Jin, K et al.: Fas (CD95) may mediate delayed cell death in hippocampal CA1 sector after global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21: 1411-1421
- ¹³¹ Garden, GA et al.: Caspase cascade in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *J Neurosci* 2002;22: 4015-4024
- ¹³² Northington, FJ et al.: Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 2001;21: 1931-1938
- ¹³³ Jevtovic-Todorovic, V et al.: Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 2003;23: 876-882
- ¹³⁴ Bittigau, P et al.: Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 15089-15094
- ¹³⁵ Gurd, JW et al.: Differential effects of hypoxia-ischemia on subunit expression and tyrosine phosphorylation at the NMDA receptor in 7- and 21-day-old rats. *J Neurochem* 2002;82: 848-856
- ¹³⁶ Mavelli, I et al.: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Biochem J* 1982;204: 535-540
- ¹³⁷ Takikawa, M et al.: Temporospatial relationship between the expressions of superoxide dismutase and nitric oxide synthase in the developing human brain: immunohistochemical and immunoblotting analyses. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;102: 572-580
- ¹³⁸ Hoehn, T et al.: Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain.. *Pediatr Res* 2003;54: 179-184
- ¹³⁹ Mishra, OP et al.: Nitric oxide-mediated Ca^{2+} -influx in neuronal nuclei and cortical synaptosomes of normoxic and hyoxic newborn piglets. *Neurosci Lett* 2002;318: 93-97
- ¹⁴⁰ Edwards, M et al.: APE/Ref-1 responses to oxidative stress in aged rats. *J Neurosci Res* 1998;54: 635-638

- ¹⁴¹ Taeusch, HW and Ballard, RA: Avery's Diseases of the Newborn, 7th ed. Saunders, Philadelphia 1998
- ¹⁴² Teitel, D: Physiologic development of the cardiovascular system in the fetus. In Fetal and Neonatal Physiology (R. Polin and W. Fox, W., Eds.), pp. 609-619. Saunders, Philadelphia 1992
- ¹⁴³ Penrice, J et al.: Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in normal preterm and term infants, and early changes after perinatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 1997;40: 6-14
- ¹⁴⁴ Robertson, NJ et al.: Characterization of cerebral white matter damage in preterm infants using ¹H and ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20: 1446-1456
- ¹⁴⁵ Heumann, R: Neurotrophin signalling. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4: 668-679
- ¹⁴⁶ Okoye, G et al.: Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death form rhodopsin mutation or oxidative damage. *J Neurosci* 2003;23: 4164-4172
- ¹⁴⁷ Yamada, H et al.: Hyperoxia causes decreased expression of vascular endothelial growth factor and endothelial cell apoptosis in adult retina. *H. J Cell Physiol* 1999;179: 149-156
- ¹⁴⁸ Lu, Y et al.: Activated Akt protects the lung from oxidant-induced injury and delays death of mice. *J Exp Med* 2001;193: 545-549
- ¹⁴⁹ Kornblum, HI et al.: Induction of brain derived neurotrophic factor mRNA by seizures in neonatal and juvenile rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;44: 219-228
- ¹⁵⁰ Felderhoff-Mueser, U et al.: Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 2002;11: 231-245
- ¹⁵¹ Climent, E et al.: Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res* 2002;68: 213-225
- ¹⁵² Han, BH and Holtzman, DM: BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via ERK pathway. *J Neurosci* 2000;20: 5775-5781
- ¹⁵³ Serpier, H et al.: Antagonistic effects of interferon-gamma and interleukin-4 on fibroblast cultures. *J Invest Dermatol* 1997;109: 158-162
- ¹⁵⁴ Bennett, BL et al.: Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor α -stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF- κ B. *J Biol Chem* 1997;272: 10212-10219
- ¹⁵⁵ Venters, HD et al.: A new concept in neurodegeneration : TNF α is a silencer of survival signals. *Trends Neurosci* 2000;23: 175-180
- ¹⁵⁶ Allan, SM and Rothwell, NJ: Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2001;2: 734-744
- ¹⁵⁷ Botchkina, GI et al.: Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med* 1997;3: 765-781
- ¹⁵⁸ Knobloch, SM et al.: Early neuronal expression of tumor necrosis factor- α after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* 1999;95: 115-125
- ¹⁵⁹ Barone, FC et al.: Tumor necrosis factor- α . A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997;28: 1233-1244
- ¹⁶⁰ New, DR et al.: HIV-1 Tat induces neuronal death via tumor necrosis factor- α and activation of non-N-methyl-D-aspartate receptors by a NF- κ B-independent mechanism. *J Biol Chem* 1998;273: 17852-17858
- ¹⁶¹ Sullivan, PG et al.: Exacerbation of damage and altered NF- κ B activation in mice lacking tumor necrosis factor receptor after traumatic brain injury. *J Neurosci* 1999;19: 6248-6256
- ¹⁶² Pomerantz, BJ et al.: Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2871-2876
- ¹⁶³ McRae, A et al.: Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 1995;84: 245-252
- ¹⁶⁴ Yatsiv, I et al.: Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22: 971-978
- ¹⁶⁵ Relton, JK and Rothwell, NJ: Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull* 1992;29: 243-246
- ¹⁶⁶ Loddick, SA and Rothwell, NJ: Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16: 932-940
- ¹⁶⁷ Yakovlev, AG et al.: Activation of CPP32-like caspase contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* 1997;17: 7415-7424

- ¹⁶⁸ Cheng, Y et al.: Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 1998;101: 1992-1999
- ¹⁶⁹ Hara, H et al.: Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 2007-2012
- ¹⁷⁰ Rabuffetti, M et al.: Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2000;20: 4398-4404
- ¹⁷¹ Fink, KB et al.: Reduction of post-traumatic brain injury and free radical production by inhibition of the caspase-1 cascade. *Neuroscience* 1999;94: 1213-1218
- ¹⁷² Schielke, GP et al.: Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18: 180-185
- ¹⁷³ Yrjanheikki, J et al.: A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 13496-13500
- ¹⁷⁴ Aizawa, Y et al.: Cloning and expression of interleukin-18 binding protein. *FEBS Lett* 1999;445: 338-342
- ¹⁷⁵ Kim SH et al.: Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97: 1190-1195
- ¹⁷⁶ Novick, D et al.: Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 1999;10: 127-136
- ¹⁷⁷ Novick, D et al.: A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine* 2001;14: 334-342
- ¹⁷⁸ Reznikov, LL et al.: IL-18 binding protein increases spontaneous and IL-1-induced prostaglandin production via inhibition of IFN-[gamma]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97: 2174-2179
- ¹⁷⁹ Dinarello, CA and Fantuzzi, G: Interleukin-18 and host defense against infection. *JID* 2003;187: 370-384
- ¹⁸⁰ Strle, K et al.: Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol* 2001 ;21: 427-449
- ¹⁸¹ Kelly, A et al.: The anti-inflammatory cytokine, interleukin (IL-)10, blocks the inhibitory effect of IL-1 beta on long term potentiation. A role for JNK. *J Biol Chem* 2001;276: 45564-45572
- ¹⁸² Vitkovic, L et al.: Anti-inflammatory cytokines : expression and action in the brain. *Neuroimmunomodulation* 2001;9: 295-312
- ¹⁸³ Mattson, MP et al.: Fibroblast growth factor and glutamate: opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J Neurosci* 1989;9: 3728-3732
- ¹⁸⁴ Schottelius, AJG et al.: Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kB kinase activity and nuclear factor kB DNA binding. *J Biol Chem* 1999;274: 31868-31874
- ¹⁸⁵ Du, Y et al.: Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 11657-11662
- ¹⁸⁶ Tanneti, L and Lipton, SA: Involvement of activated caspase-3 like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 2000;74: 134-142
- ¹⁸⁷ Moran, J et al.: Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 1999;73: 568-577
- ¹⁸⁸ Grilli, M et al.: Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischemic damage. *Eur J Neurosci* 2000;12: 1-8
- ¹⁸⁹ Bethea, JR et al.: Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 1999;16: 851-863
- ¹⁹⁰ Di, Santo, E et al.: Systemic interleukin 10 administration inhibits brain tumor necrosis factor production in mice. *Eur J Pharmacol* 1997;336: 197-202